



Universidade de Aveiro
2017

Departamento de Química

**Ana Cristina Quintans
da Silva**

**Desenvolvimento de membranas de nanocelulose
bacteriana e fucoidano para regeneração da pele**



**Ana Cristina Quintans
da Silva**

**Desenvolvimento de membranas de nanocelulose
bacteriana e fucoidano para regeneração da pele**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, especialização em Métodos Biomoleculares, realizada sob a orientação científica da Doutora Carmen Sofia da Rocha Freire Barros, Investigadora Principal do CICECO – Instituto de Materiais de Aveiro, Universidade de Aveiro, e da Doutora Sónia Andreia Oliveira Santos, Investigadora de pós-doutoramento do CICECO – Instituto de Materiais de Aveiro, Universidade de Aveiro.

“I may have not avoided certain wounds in my life, but I do appreciate these scars because they are a constant reminder of my victories.”

Gugu Mona

o júri

Arguente principal

Doutora Paula Alexandrina de Aguiar Pereira Marques

Investigadora Principal do TEMA – Centro de Tecnologia Mecânica e Automação, Universidade de Aveiro.

Orientadora

Doutora Carmen Sofia da Rocha Freire Barros

Investigadora Principal do CICECO – Instituto de Materiais de Aveiro, Universidade de Aveiro.

Presidente

Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues

Professor auxiliar com agregação do departamento de Química da Universidade de Aveiro, Universidade de Aveiro.

Agradecimentos

A Ti, Senhor, por todas a graças que me concedes.

À Doutora Carmen Freire e à Doutora Sónia Santos por toda a orientação e tempo disponibilizado ao longo deste ano, assim como todo o conhecimento compartilhado.

À Doutora Carla Vilela, um agradecimento especial, pelo apoio incansável prestado no decorrer deste ano de dissertação e, sem a qual, não seria possível realizar este trabalho.

Ao Doutor Bruno Neves, à Celeste Azevedo, ao Doutor Ricardo Pinto e a todos os alunos de doutoramento e bolsiros do grupo *LignoMacro*, pela sua colaboração na realização deste trabalho.

Ao grupo de investigação que me acompanhou nesta caminhada, obrigada pelo bom ambiente de trabalho, boa disposição e todo o auxílio que me foi concedido quando mais necessitei.

Aos meus amigos. Não irei especificar nomes com receio de incorrer em algum esquecimento, mas acho que não é necessário... saberão certamente a quem eu me estou a dirigir. A vocês, que me ensinaram a acreditar nas minhas capacidades, que nunca me deixaram desanimar ao longo destes anos, que me deram forças para continuar e que me fizeram sorrir em tempos de aflição...

Às minhas colegas de casa, as Fadinhas do Lar, por serem a minha segunda família aqui nesta terra que me acolheu. Mais que minhas amigas, são as minhas irmãs do coração.

Por último, mas claramente não menos importante, quero agradecer à minha família. Por acreditarem em mim, por me ajudarem, por me aturarem... Por me darem a oportunidade de perseguir os meus sonhos...

A todos vós, o meu sincero obrigada.

"We must find time to stop and thank the people who make a difference in our lives."

John F. Kennedy

Palavras-chave

Fucoidano, nanocelulose bacteriana, membranas, regeneração de pele, curativos, tratamento de feridas

Resumo

O corpo humano é suscetível a um grande número de lesões, como é o caso das feridas cutâneas, que são consideradas o tipo de lesão mais frequente. Normalmente, as feridas são curadas de forma natural pelo corpo, contudo, vários fatores, como a idade e inflamação, podem dificultar esta reparação natural, existindo assim uma preocupação crescente quanto ao tratamento de feridas e regeneração da pele. São vários os tratamentos que podem ser aplicados na regeneração de pele sendo, contudo, os curativos (pensos) os mais utilizados.

O uso de polímeros naturais para o desenvolvimento de novos materiais para aplicação na regeneração da pele tem demonstrado enormes potencialidades, como é o caso das membranas de nanocelulose bacteriana (BC). Apesar das suas inúmeras vantagens, as membranas de BC carecem de algumas propriedades e/ou funcionalidades, como atividade anti-inflamatória, pelo que são normalmente combinadas com outras substâncias que apresentam as funcionalidades desejadas. Neste sentido, o fucoidano, um polissacarídeo proveniente de algas castanhas, surge como um possível candidato para incorporação nas membranas de BC, uma vez que apresenta inúmeras propriedades benéficas para a saúde, sendo algumas fundamentais no processo inflamatório e de regeneração tecidual.

Neste trabalho foram desenvolvidas membranas de BC e fucoidano (5,10 e 15% m/m, em relação à massa de BC), utilizando glicerol (5% v/v do volume total de solução) como plastificante. Estas foram caracterizadas por espectroscopia de Ultravioleta-visível (UV-vis), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier acoplada a reflexão total atenuada (FTIR-ATR), microscopia eletrônica de varrimento (SEM), análise termogravimétrica (TGA), ensaios mecânicos e absorção de água. Por UV-vis foi possível verificar as propriedades óticas das membranas na região do visível e do ultravioleta. Na análise de FTIR-ATR das membranas compósitas foram identificados picos característicos do fucoidano e da BC e as micrografias de SEM revelaram também a sua incorporação nas membranas. Através da TGA verificou-se o perfil de degradação térmica das membranas, influenciado sobretudo pelo glicerol, com temperaturas de degradação iniciais de cerca de 100°C e de degradação máxima aos 230°C. Adicionalmente, estes compósitos apresentaram uma elevada capacidade de absorção de água e boas propriedades mecânicas (Módulo de Young= 232,3 ± 41,9 MPa, Resistência à tração= 30,8 ± 6,8 MPa, Elongação até rutura= 31,1 ± 6,4%) considerando a aplicação em questão.

Foram também realizados ensaios de atividade biológica do fucoidano extraído, tendo-se observado elevada atividade antioxidante (2,6 a 62,4%) para concentrações de 0,17-1,17 mg.mL⁻¹. O fucoidano não apresentou citotoxicidade até 200 µg.mL⁻¹, mas não foi possível concluir acerca da sua atividade anti-inflamatória, já que se mostrou indutor da produção de óxido nítrico em células de macrófagos de ratinhos leucêmicos, RAW 264.7, embora esta tenha sido inibida, em parte, aquando estimulação com lipopolissacarídeo (LPS).

Assim, podemos concluir que a incorporação de fucoidano nas membranas de BC foi bem sucedida, tendo estes compósitos características que permitem ponderar a sua aplicação como pensos/curativos para a regeneração da pele.

Keywords

Fucoidan, bacterial nanocellulose, membranes, skin regeneration, dressings, wound treatment

Abstract

The human body is susceptible to many injuries, as is the case of cutaneous wounds, which are considered the most frequent type of injury. Usually, wounds are naturally cured by the body, however, several factors, such as age and inflammation, can difficult this natural repair, creating a growing concern about wound treatment and skin regeneration. There are several treatments that can be applied in the regeneration of skin, however, dressings are the most used.

The use of natural polymers for the development of new materials for application in skin regeneration has demonstrated enormous potential, as is the case of bacterial nanocellulose (BC) membranes. Despite their many advantages, BC membranes lack for some properties and or functionalities, such as anti-inflammatory activity, so they are usually combined with other substances that have the desired functionalities. In this sense, fucoidan, a polysaccharide derived from brown algae, appears as a possible candidate to be incorporated into bacterial nanocellulose membranes, since it has numerous beneficial properties for health, some of which are essential in the inflammatory process and tissue regeneration.

In this work, BC and fucoidan membranes (5, 10 and 15% w/w, relative to BC) were developed using glycerol (5% v/v, relative to the total volume of solution) as a plasticizer. These were characterized by Ultraviolet-Visible (UV-vis) spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy with attenuated total reflection (FTIR-ATR), scanning electron microscopy (SEM), thermogravimetric analysis (TGA), mechanical tests and water absorption. UV-vis spectra showed membrane's optical properties in the visible and ultraviolet region. The FTIR-ATR spectra of the BC-Fucoidan membranes showed the characteristic peaks of BC and fucoidan and SEM analysis also revealed the incorporation of fucoidan in the membranes. TGA showed the degradation profile of the composites, influenced essentially by the presence of glycerol, with initial peaks at 100°C and maximum degradation occurring at 230°C. In addition, these composites have a high water absorption capacity ($W_{\max} = 18.5 \times$ pure BC) and good mechanical properties (Young's modulus = 232.3 ± 41.9 MPa, Tensile strength = 30.8 ± 6.8 MPa, Elongation at break = $31.1 \pm 6.4\%$) considering the proposed application.

Biological activity assays were performed on extracted fucoidan, and a high antioxidant activity (2.6 to 62.4%) was reported for concentrations between 0.17 and 1.17 mg.mL⁻¹. Fucoidan does not present cytotoxicity up to 200 µg.mL⁻¹, however, it was not possible to conclude about its anti-inflammatory activity, since it was shown to induce nitric oxide (NO) production in mouse leukaemic monocyte macrophage cells (RAW 264.7), although it partially inhibited NO production in lipopolysaccharide (LPS) stimulated cells.

Thus, we can conclude that the incorporation of fucoidan in BC membranes was successful and that these composites have characteristics that may allow its application as a dressing for skin regeneration.

Índice

Abreviaturas	I
Índice de figuras	III
Índice de tabelas	V
1. Contextualização	1
2. Introdução	5
2.1. Mecanismo de reparação de tecidos e tratamento de feridas	7
2.1.1. Danificação da pele e sua regeneração	7
2.1.2. Tratamento clássico de feridas	9
2.1.3. Novas abordagens para o tratamento de feridas.....	11
2.2. Nanocelulose bacteriana.....	12
2.2.1. Caracterização e propriedades da nanocelulose bacteriana	12
2.2.2. Aplicações da nanocelulose bacteriana	15
2.2.3. Modificação das propriedades das membranas de nanocelulose bacteriana	17
2.3. Fucoidano	20
2.3.1. Caracterização do fucoidano.....	20
2.3.2. Metodologias de extração	21
2.3.3. Propriedades do fucoidano e sua aplicação	22
2.3.4. Fucoidano e o mecanismo de reparação da pele	25
3. Procedimento experimental.....	27
3.1. Materiais.....	29
3.2. Produção de membranas de nanocelulose bacteriana	29
3.3. Extração do fucoidano	29
3.4. Caracterização do fucoidano extraído de <i>Fucus vesiculosus</i>	31
3.5. Incorporação do fucoidano nas membranas de nanocelulose bacteriana.....	31
3.6. Caracterização das membranas de BC-fucoidano	32
3.7. Avaliação da atividade biológica do extrato de fucoidano	33
3.7.1. Avaliação da atividade antioxidante	34
3.7.2. Determinação da viabilidade celular	34
3.7.3. Determinação da atividade anti-inflamatória.....	35
4. Resultados e discussão.....	37
4.1. Extração do fucoidano de <i>Fucus vesiculosus</i>	39

4.2.	Incorporação de fucoidano proveniente de <i>Fucus vesiculosus</i> em membranas de nanocelulose bacteriana.....	42
4.3.	Caracterização das membranas.....	44
4.3.1.	Espetroscopia de UV-vis	45
4.3.2.	Espetroscopia de infravermelho com transformada de Fourier acoplada a reflexão total atenuada (FTIR-ATR)	47
4.3.3.	Microscopia eletrônica de varrimento (SEM)	48
4.3.4.	Análise termogravimétrica (TGA)	52
4.3.5.	Ensaio mecânicos.....	55
4.3.6.	Absorção de água	60
4.4.	Avaliação da atividade biológica.....	62
4.4.1.	Determinação da atividade antioxidante do fucoidano extraído	62
4.4.2.	Avaliação da viabilidade celular de RAW 264.7 na presença de fucoidano	64
4.4.3.	Determinação da atividade anti-inflamatória do fucoidano.....	65
5.	Conclusões	69
6.	Bibliografia	73

Abreviaturas

		<i>Do inglês</i>
3D	Tridimensional	
AC	Ácido cítrico	
AP-1	Proteína ativadora 1	<i>Activator protein 1</i>
AT	Ácido tânico	
BC	Nanocelulose bacteriana	<i>Bacterial cellulose</i>
BC/Glic	Membrana da nanocelulose bacteriana com glicerol (5% v/v)	
BC/Glic/Fuc10	Membrana da nanocelulose bacteriana, com glicerol e fucoidano (10% m/m)	
BC/Glic/Fuc15	Membrana da nanocelulose bacteriana, com glicerol e fucoidano (15% m/m)	
BC/Glic/Fuc5	Membrana da nanocelulose bacteriana, com glicerol e fucoidano (5% m/m)	
COX-2	Ciclooxigenase-2	
CS	Celulose sintase	
DMEM	Meio de <i>Eagle</i> modificado de <i>Dulbecco</i>	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo	<i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>
EAE	Extração assistida por enzimas	
EGF	Fator de crescimento epidérmico	<i>Epidermal growth factor</i>
FBP	Frutose-1,6-bisfosfatase	<i>Fructose biphosphatase</i>
FBS	Soro fetal de bovino	<i>Fetal bovine serum</i>
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos	<i>Fibroblast growth factor</i>
FK	Frutocinase	<i>Frutokinase</i>
FTIR-ATR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier acoplada a reflexão total atenuada	<i>Attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy</i>
Fuc	Fucoidano	
Fuc_PT	Fucoidano obtido a partir de alga pré-tratada	
FV	Extrato de alga <i>Fucus vesiculosus</i>	
FVT	Extrato de alga <i>Fucus vesiculosus</i> pré-tratado	
G	Ácido glucurónico	
G1P	Glucose-1-fosfato	<i>Glucose-1-phosphate</i>
G6P	Glucose-6-fosfato	<i>Glucose-6-phosphate</i>
GK	Hexocinase	<i>Glucokinase</i>
Glc	Glucose	
HIV	Vírus da imunodeficiência humana	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência	<i>High-performance liquid chromatography</i>
HS	<i>Hestrin-Schramm</i>	
IL-1-β	Interleucina-1- <i>beta</i>	
IL-6	Interleucina-6	
INF-γ	Interferão- <i>gama</i>	

iNOS	Óxido nítrico sintase induzível	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
IV	Infravermelho	
LMWF	Fucoidano de baixo peso molecular	<i>Low molecular weight fucoidan</i>
LPS	Lipopolissacarídeo	
M	Ácido manurónico	
m/m	Razão massa/massa	
m/v	Razão massa/volume	
MAE	Extração assistida por microondas	<i>Microwave assisted extraction</i>
MAPK	Proteína cinases ativada por mitogénio	<i>Mitogen activated protein kinases</i>
MMPs	Metaloproteínas de matriz	<i>Matrix metalloproteinases</i>
MW	Peso molecular	<i>Molecular weight</i>
NF-κB	Fator nuclear <i>kappa B</i>	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NO	Óxido nítrico	<i>Nitric oxide</i>
PAF	Fator ativador de plaquetas	<i>Platelet-activating factor</i>
PC	Peso corporal	
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas	<i>Platelet derived growth factor</i>
PEG	Poli(etilenoglicol)	
PFK-1	Fosfofrutocinase-1	<i>Phosphofructokinase 1</i>
PGE2	Prostaglandina E2	
PGI	Fosfoglucoisomerase	<i>Phosphoglucose isomerase</i>
PGM	Fosfoglucomutase	<i>Phosphoglucomutase</i>
PTS	Sistema de fosfotransferases	<i>Phosphotransferase system</i>
RNA	Ácido ribonucleico	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	Espécies reativas de oxigénio	<i>Reactive oxygen species</i>
SEM	Microscopia eletrónica de varrimento	<i>Scanning electron microscopy</i>
SI	Sistema Internacional	
T	Temperatura	
TGA	Análise termogravimétrica	<i>Thermogravimetric analysis</i>
TGF-β	Fator de crescimento <i>beta</i> -transformante	<i>Transforming growth factor beta</i>
TNF-α	Fator de necrose <i>alfa</i> -tumoral	<i>Tumoral necrose factor-alfa</i>
UAE	Extração assistida por ultrassons	<i>Ultrasound-assisted extraction</i>
UDPGlc	Uridina difosfato glucose	<i>Uridine diphosphate glucose</i>
UGP	Pirofosforilase de uridina difosfogluco	<i>UDP-glucose-pyrophosphorylase</i>
UV	Ultravioleta	
v/v	Razão volume/volume	
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
Vis	Visível	
W	Absorção de água	<i>Water uptake</i>

Índice de figuras

Figura 1: Representação esquemática do mecanismo de reparação da pele - após a hemóstase, o local lesionado permanece inflamado durante algum tempo, de forma a promover a proliferação de células responsáveis pela regeneração do tecido que, por fim, sofre remodelação (adaptado de (9)).	8
Figura 2: Materiais utilizados no tratamento clássico de feridas - adesivos de gaze (a), pensos de baixa aderência (b) e pensos de película transparente (c).	10
Figura 3: Estrutura química da celulose (adaptado de (37)).	13
Figura 4: Via bioquímica de síntese de celulose bacteriana; GK (hexocinase), PGM (fosfoglucomutase), UGP (pirofosforilase de uridina difosfato glucose) e CS (celulose sintase) são as enzimas envolvidas no processo (adaptado de (34)).	14
Figura 5: Celulose bacteriana produzida em cultura estática (a) e em cultura agitada (b) e imagem SEM da rede 3D formada pelas nanofibras de BC (c) (38).	14
Figura 6: Aplicações da celulose bacteriana - produção de 'nata de coco' (a), de diafragmas de sistemas sonoros (b) e de máscaras para a pele (c) (44,45).	16
Figura 7: Efeito da adição de quitosano na propagação de fibroblastos de ratinhos após incubação durante 24h, 48h e 72h. É possível verificar um maior crescimento celular nas culturas em que foi utilizado o quitosano, relativamente ao controlo (57).	18
Figura 8: Imagens SEM da aplicação de compósitos de BC e alginato na estimulação do crescimento de culturas de fibroblastos de gengiva humana (a) e comparação da superfície de membranas de BC (b) e BC-alginato (c) (adaptado de (62,63)).	19
Figura 9: Estrutura de um fucoidano existente em algas <i>Fucaceae</i> (adaptado de (6)).	20
Figura 10: Ação anti-inflamatória do fucoidano, por diminuição da produção de ROS e NO em embriões do modelo peixe-zebra estimulados com LPS, relativamente ao controlo (células sem LPS e fucoidano) (adaptado de (83)).	25
Figura 11: Fucoidano extraído utilizando o método de extração assistido por microondas (MAE).	40
Figura 12: Comparação entre o fucoidano obtido a partir da <i>F. vesiculosus</i> sem (Fuc) e com pré-tratamento (Fuc_PT).	41
Figura 13: Espectros de FTIR-ATR do fucoidano extraído de <i>Fucus vesiculosus</i> com e sem pré-tratamento (Fuc_PT e Fuc, respetivamente).	42

Figura 14: Comparação entre a membrana de nanocelulose bacteriana (BC) (em cima) e a membrana de nanocelulose bacteriana e fucoidano a 15% (BC/Fuc15) (em baixo). ..	43
Figura 15: Membranas de BC, BC/Glic e BC/Glic/Fuc com diferentes quantidades de fucoidano, após secagem na estufa.	44
Figura 16: Espectros de UV-vis das membranas BC, BC/Glic e BC/Glic/Fuc, entre 250-700 nm (em cima), e com aproximação na região do ultravioleta (centro) e do visível (em baixo).....	46
Figura 17: Espectros de FTIR-ATR de fucoidano pré-tratado (Fuc_PT) e das membranas BC, BC/Glic e BC/Glic/Fuc.	48
Figura 18: Micrografias de SEM de BC a diferentes ampliações.	49
Figura 19: Micrografias de SEM de BC/Glic e BC/Glic/Fuc.....	50
Figura 20: Micrografias de SEM da secção transversal (zona de quebra) das membranas de BC, BC/Glic e BC/Glic/Fuc.....	51
Figura 21: Curvas de TGA e dTGA de fucoidano extraído a partir de <i>Fucus vesiculosus</i> pré-tratada com clorofórmio e metanol (Fuc_PT) no intervalo 20-800°C.	53
Figura 22: Curvas de perda de massa, em percentagem, das membranas de BC, BC/Glic e BC/Glic/Fuc e do fucoidano no intervalo 20-800°C.	54
Figura 23: Curvas das derivadas das perdas de massa, das membranas de BC, BC/Glic e BC/Glic/Fuc e do fucoidano, no intervalo 20-800°C.....	54
Figura 24: Gráfico do módulo de Young (MPa) calculado para cada membrana (BC, BC/Glic e BC/Glic/Fuc) a partir dos valores médios para cada espécime utilizado nos ensaios de tração.	57
Figura 25: Resistência à tração (MPa) de cada membrana, calculada a partir do valor médio para cada espécime.	58
Figura 26: Percentagem de alongação da membrana até à sua rutura, calculada a partir dos valores médios de cada espécime.	59
Figura 27: Percentagem de água absorvida (W) pelas membranas após 0,5, 8 e 24h de imersão em água destilada, à temperatura ambiente.....	61
Figura 28: Inibição do radical DPPH (%) após adição do fucoidano, utilizando amostras com concentrações variáveis deste composto.	63
Figura 29: Viabilidade celular (%) de amostras com diferentes concentrações de fucoidano extraído de <i>F. vesiculosus</i>	65
Figura 30: Estudo da atividade anti-inflamatória do fucoidano extraído de <i>F. vesiculosus</i> , através da libertação de óxido nítrico (NO).....	65

Índice de tabelas

Tabela 1: Composição das membranas BC/Fuc15 e BC/Glic/Fuc15. % ^a percentagem em relação à massa de BC na membrana e % ^b percentagem relativamente ao volume de solução.....	31
Tabela 2: Composição das membranas BC, BC/Glic e BC/Glic/Fuc. % ^a percentagem em relação à massa de BC na membrana e % ^b percentagem relativamente ao volume de solução.....	32
Tabela 3: Propriedades mecânicas (modulo de Young, resistência à tração e alongação até à quebra) das membranas BC, BC/Glic e BC/Glic/Fuc.....	56

1. Contextualização

As feridas são um dos tipos de lesões com maior ocorrência no corpo humano, sendo as cutâneas as mais prevalentes e comuns. Este tipo de lesões pode ser mais ou menos complexo, tendo em conta a sua génese, localização, tamanho, profundidade e duração, entre outros fatores, e muitas vezes necessita de cuidados médicos para garantir a eficácia do seu tratamento (1).

Muitos são os fatores que podem promover uma má cicatrização do tecido envolvido, uma recuperação mais prolongada ou até mesmo o aparecimento de inflamação exacerbada e infeção no local afetado, dificultando o tratamento da lesão (2). Assim, surge a necessidade de desenvolver novos materiais e tratamentos que promovam uma recuperação mais rápida e eficiente dos tecidos danificados, tendo em conta uma abordagem mais rentável e ecológica.

A nanocelulose bacteriana (BC) é um material gelatinoso biodegradável e biocompatível, com a mesma composição química que a celulose vegetal mas que possui propriedades físicas e químicas distintas como diferente morfologia, elevada pureza, elevada resistência mecânica e capacidade de retenção de água, que permitem a sua aplicação na indústria alimentar, no fabrico de compósitos, têxteis, cosméticos e em particular na área biomédica, com especial foco na produção de curativos para a pele (3,4). No entanto, a BC carece de algumas propriedades como propriedades antimicrobiana e anti-inflamatória, sendo muitas vezes necessário a incorporação de outros compostos, que possuam estas características, de forma a obter um material com uma atuação mais eficaz.

Trabalhos recentes referem a combinação de alguns polissacarídeos de origem marinha, como o quitosano, com BC para a produção de novos biomateriais funcionais (5). As características conferidas pela presença destes polissacarídeos tornam o biomaterial mais eficaz na cicatrização da pele e prevenção de infeções e outras complicações. O fucoidano é um polissacarídeo que pode ser extraído a partir de várias espécies de algas castanhas e que possui elevado interesse devido às suas propriedades anticoagulantes, anti-trombóticas, anti-inflamatórias, antioxidantes e antitumorais tendo, por esse motivo, sido alvo de investigação no desenvolvimento de vários biomateriais (6).

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho consiste na incorporação deste polissacarídeo de origem marinha, o fucoidano, em membranas de BC e sua caracterização para posterior aplicação em engenharia de regeneração da pele.

A presente dissertação encontra-se dividida em cinco capítulos, sendo que no primeiro são abordados alguns aspetos teóricos do estado da arte, como introdução ao tema deste trabalho (capítulo 2). De seguida, são referidos os materiais e metodologias utilizados para o desenvolvimento e caracterização das membranas (capítulo 3), os resultados obtidos durante a atividade experimental e sua discussão (capítulo 4), e as principais conclusões desta dissertação (capítulo 5). Por fim, o último capítulo contém toda a bibliografia consultada para a elaboração desta dissertação (capítulo 6).

2. Introdução

2.1. Mecanismo de reparação de tecidos e tratamento de feridas

2.1.1. Danificação da pele e sua regeneração

Uma ferida é um tipo de lesão que pode ser definida como uma disrupção da integridade epitelial dos tecidos que pode envolver tecidos sub-epiteliais, como a derme e o músculo, dependendo da sua profundidade (7). Este tipo de lesões pode ser acidental, intencional ou até mesmo fazer parte do processo de uma doença e é causado por trauma físico, originando um corte ou perfuração da pele (ferida aberta) ou uma contusão (ferimento fechado) (1).

Existem várias classificações de ferimentos considerando a sua causa, o tipo de tecidos envolvidos, a abertura e profundidade da lesão ou até mesmo a duração do processo de cicatrização (1,8). Esta última é a mais utilizada, dividindo as feridas em agudas, se forem mais recentes e cicatrizarem em tempo e forma considerados adequados à lesão, ou crônicas, se não se conseguem tratar num período de tempo e forma previstos, sendo muitas vezes recorrentes.

A cicatrização de feridas é um processo biológico normal do corpo humano que consiste em quatro fases, hemóstase, inflamação, proliferação e remodelação do tecido, que decorrem numa sequência específica (Figura 1), podendo algumas etapas decorrer em simultâneo (8,9). Estes eventos complexos envolvem a interação de células, mediadores químicos, fatores de crescimento e citocinas, culminando com o fecho da lesão.

A primeira fase do mecanismo de reparação, hemóstase, é muitas vezes referida como uma fase de latência na qual se dá a interrupção da hemorragia por meios mecânicos, físicos e/ou químicos (10,11). Inicia-se a cascata de coagulação, seguida de vasoconstricção (que reduz a perda de sangue) e o preenchimento da fenda com um coágulo de fibrina, formando uma matriz provisória no local lesado. O coágulo e o tecido circundante libertam citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento, como o fator de crescimento transformante (TGF- β), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e o fator de crescimento epidérmico (EGF) que desempenham um papel importante no recrutamento de neutrófilos, fibroblastos e monócitos para o local da ferida e estimulam a secreção de tecido conjuntivo (12).

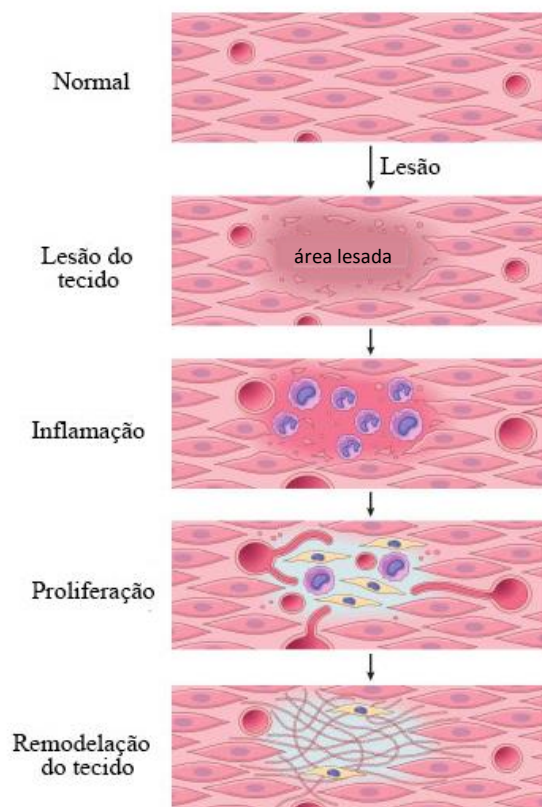


Figura 1: Representação esquemática do mecanismo de reparação da pele - após a hemóstase, o local lesionado permanece inflamado durante algum tempo, de forma a promover a proliferação de células responsáveis pela regeneração do tecido que, por fim, sofre remodelação (adaptado de (9)).

A inflamação surge, de seguida, com a infiltração sequencial de neutrófilos, macrófagos e linfócitos e é caracterizada por sintomas como dor, rubor, calor e edema (9,11). Os neutrófilos libertam substâncias antimicrobianas e proteases, eliminando micróbios e detritos celulares, e mediadores químicos, como o fator de necrose tumoral ($\text{TNF-}\alpha$) e interleucinas ($\text{IL-1}\beta$, IL-6), que amplificam a resposta inflamatória e estimulam o processo regenerativo. Outros mediadores (histamina, prostaglandinas, leucotrienos, quimiocinas, fator ativador de plaquetas (PAF)) também são libertados nesta fase e são responsáveis pela vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, febre e dor características desta etapa (9,13). Os macrófagos libertam citocinas que estimulam a inflamação e promovem a transição para a fase seguinte do processo regenerativo (fase proliferativa) (12). Os linfócitos T migram para o local no fim desta etapa, sendo o seu envolvimento no mecanismo de cicatrização ainda desconhecido.

Os principais objetivos da fase proliferativa, que ocorre cerca de 3 a 7 dias após a lesão, são a reepitelização (restauração da epiderme no local ferido) e a angiogénese

(criação de vasos sanguíneos) (13,14). Moléculas como o interferão (INF- γ) e o TGF- β regulam a síntese de colagénio, fibronectina e outras substâncias essenciais para o fecho do tecido e a restauração da sua força mecânica. O processo de reepitelização é levado a cabo por queratinócitos, presentes nas zonas laterais da ferida, e fibroblastos que sintetizam colagénio e outros componentes da matriz extracelular. Na angiogénese encontram-se envolvidos fatores de crescimento (VEGF, PDGF) que se ligam a recetores de células endoteliais de vasos pré-existentes, ativando cascatas de sinalização intracelular que culminam com a formação e maturação de artérias e veias e retorno do fluxo sanguíneo (10,13).

A remodelação do tecido é a última etapa do processo de regeneração, podendo ter uma duração de vários anos (15). O colagénio do tipo III, presente no tecido de granulação da fase proliferativa, é substituído por colagénio tipo I, um processo mediado sobretudo pela ação de metaloproteinases de matriz (MMPs). A ferida sofre também alguma contração e tensão física durante todo o processo, devido ao aparecimento de fibroblastos contráteis (miofibroblastos) no local, que se acreditam estar na origem da formação de cicatrizes no local afetado (14,15).

Este mecanismo ocorre quer em feridas agudas quer em crónicas apesar de, nestas últimas, se dar uma fase inflamatória prolongada que se traduz, a nível bioquímico, em níveis excessivos de citocinas pró-inflamatórias, proteases, espécies reativas de oxigénio (ROS) e células senescentes, assim como persistência de infeção (16).

Apesar do processo regenerativo ocorrer naturalmente no corpo humano, muitas vezes este tipo de lesões requer atenção e cuidados especiais (2,8). São vários os fatores que podem retardar o fecho do ferimento e dificultar a sua cicatrização, podendo ser divididos essencialmente em dois tipos: locais, como a oxigenação dos tecidos envolvidos e o aparecimento de infeções, ou sistémicos, como a idade, o *stress*, os níveis hormonais, a toma de medicamentos, o consumo de álcool e tabaco, a dieta e até mesmo algumas doenças como a diabetes (2,8,17).

2.1.2. Tratamento clássico de feridas

Como referido anteriormente, para garantir uma regeneração rápida e completa do tecido danificado é necessário ter alguns cuidados. Para pequenos ferimentos, que afetam apenas a derme, muitas vezes basta recorrer à limpeza da ferida e aplicação de um penso rápido para proteger o local de microrganismos e sujidade, garantindo uma recuperação mais eficiente (18). Para ferimentos mais profundos é necessário outro tipo

de tratamentos, normalmente sugeridos por um profissional de saúde após a análise da lesão. No entanto, os pensos são o tipo de tratamento mais frequente para as feridas da pele e, idealmente, um penso para este tipo de lesões deverá apresentar um conjunto de características adequadas, como a manutenção da humidade local, remoção do excesso de exsudado, controlo da temperatura da ferida, controlo do odor, prevenir a entrada de microrganismos, permitir a troca de gases, minimizar a formação de cicatrizes, conformação ao local lesado e substituição fácil (19,20). Para além destas características, e de forma a ser viável a sua aplicação em larga escala, é necessário que este tipo de curativos seja económico e de fácil implementação em ambiente hospitalar (19,21).

Os adesivos de gaze ou algodão (Figura 2,a) são provavelmente os curativos mais tradicionais, sendo utilizados preferencialmente em feridas superficiais limpas (21). No entanto, este tipo de pensos requer mudança frequente, cuidado para não humedecer a área do curativo e pode causar lesões na pele aquando da sua remoção, pelo que já não é a metodologia mais utilizada atualmente.



Figura 2: Materiais utilizados no tratamento clássico de feridas - adesivos de gaze (a), pensos de baixa aderência (b) e pensos de película transparente (c).

Pensos de baixa aderência (Figura 2,b) são uma alternativa aos tradicionais adesivos de gaze seca, já que este tecido é impregnado com parafina, que diminui a aderência ao ferimento e mantém a humidade local (21). Estes pensos podem ainda conter iodopovidona ou outros agentes com elevada atividade antibacteriana, sendo indicados em pequenos ferimentos com sinais de infeção (22,23).

Os pensos de película transparente (Figura 2,c), constituídos por poliuretanos semipermeáveis revestidos com um adesivo acrílico, são também utilizados como alternativa aos adesivos de gaze, já que se conformam melhor ao corpo do paciente, são

impermeáveis à água e germes (mas permeáveis a ar e gases) e permitem a avaliação da ferida sem a remoção do curativo (18).

Os pensos de baixa aderência e de película transparente são amplamente utilizados em ambiente hospitalar, sendo economicamente favoráveis, e contêm a maioria das características ideais de um curativo (18). No entanto, os materiais utilizados nestes pensos não são biodegradáveis, pelo que o seu uso massivo constitui um problema a nível ambiental. Assim, a procura por novos pensos recorrendo a materiais mais sustentáveis e de origem natural é um tópico de crescente interesse, levando ao aparecimento de novos sistemas que, tendo como base o conhecimento do mecanismo de reparação tecidual, podem possuir propriedades que aumentem a sua eficácia na regeneração da pele. Estes sistemas serão abordados, sumariamente, no subtópico seguinte.

2.1.3. Novas abordagens para o tratamento de feridas

O principal objetivo do tratamento de ferimentos é sarar a lesão no menor tempo possível de forma a prevenir a ocorrência de infeção e minimizar a dor, o desconforto e a formação de cicatrizes (24). Novas metodologias têm sido aplicadas nesta área, tendo em conta o conhecimento atual dos mecanismos moleculares e celulares subjacentes a ferimentos, garantindo as condições necessárias para uma recuperação mais acelerada e eficaz.

Nos últimos anos têm sido desenvolvidos vários pensos inovadores utilizando diversos biomateriais, substâncias naturais ou sintéticas que são usadas no tratamento ou substituição de qualquer tecido, órgão ou função corporal (24). O uso de polímeros naturais (p. ex., celulose, alginato, quitina, colagénio, gelatina, queratina e fibrina) na manutenção de feridas e queimaduras tem sido amplamente descrita na literatura, devido à sua elevada biocompatibilidade, biodegradabilidade e semelhança com as macromoléculas existentes na pele, o que promove a proliferação e diferenciação celular (1,25,26). Para além das vantagens já mencionadas, os curativos (hidrogéis, hidrocolóides, espumas e filmes) com biopolímeros naturais demonstram ter boas propriedades mecânicas e, apesar de apresentarem um custo mais elevado, podem ser economicamente favoráveis já que, dependendo do material utilizado, podem requerer um menor número de substituições (24,27).

Para além do uso de polímeros naturais (ou derivados) no desenvolvimento de curativos foi também reportado o seu uso no desenvolvimento de substitutos de pele

(por exemplo, filmes de quitosano e gelatina) e tecidos artificiais (geralmente constituídos por colagénio ou fibronectina) para regeneração da epiderme e melhoria do processo de cicatrização no tratamento de feridas e queimaduras severas (5,25,28). Estes materiais podem ainda ser utilizados para a libertação controlada de moléculas envolvidas no mecanismo de cicatrização, como fatores de crescimento (29,30).

Outros tratamentos como a terapia laser, a terapia de oxigénio hiperbárico, a aplicação tópica de géis, como os de curcumina, e injeção com corticosteróides podem também ser utilizados, como alternativa aos curativos, para facilitar o processo regenerativo e diminuir as cicatrizes formadas (15,31–33). Estas abordagens são geralmente utilizadas apenas em casos em que o paciente sofre um ferimento muito profundo e/ou grave, de difícil cicatrização, não sendo, portanto, as metodologias mais praticadas.

É importante ainda referir que no caso de feridas crónicas existe uma maior dificuldade de fecho do local lesado e de infeção persistente, que pode ser agravada pela presença de elevadas quantidades de exsudado e tecido necrótico no local lesado, que serve como meio de crescimento de bactérias, contribuindo para a infeção da ferida (16). Assim, é necessário recorrer a outros tipos de tratamento, como é o caso de metodologias de desbridamento e o uso tópico de antibióticos, que aliadas às metodologias previamente mencionadas permitem manter a ferida limpa, acelerando a cicatrização destas lesões.

O subtópico seguinte irá focar a caracterização e propriedades dos polímeros naturais, celulose bacteriana e fucoidano, que serão utilizados neste trabalho para o desenvolvimento de novos biomateriais para o tratamento de feridas agudas, que são as mais recorrentes no quotidiano.

2.2. Nanocelulose bacteriana

2.2.1. Caracterização e propriedades da nanocelulose bacteriana

O biopolímero mais abundante na natureza é a celulose, um homopolissacarídeo de unidades de glucose unidas por ligações glicosídicas β -(1,4) que se pode encontrar na parede celular de praticamente todas as plantas, de alguns organismos semelhantes a fungos (*Oomycetes*) e algumas algas (3). Várias bactérias pertencentes aos géneros *Gluconacetobacter*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*,

Rhizobium, *Sarcina* e *Salmonella*, entre outros, são também capazes de produzir um tipo de celulose designado por nanocelulose bacteriana (BC) (34).

A celulose existente nas plantas surge normalmente associada a lenhina, hemiceluloses e outras substâncias que desempenham papéis específicos na sua fisiologia (3). A BC tem uma composição química idêntica à celulose encontrada nas plantas (Figura 3) mas é produzida por bactérias numa forma pura, ou seja, não se encontra associada a outras biomoléculas, e possui propriedades que a diferenciam da forma vegetal, pelo que se tem sido considerada em aplicações nas quais a celulose vegetal não é tão promissora (35,36).

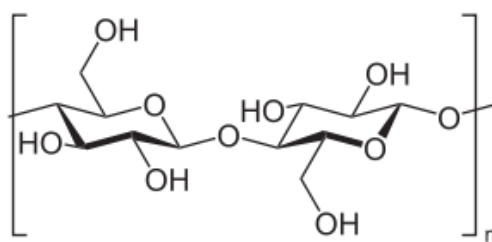


Figura 3: Estrutura química da celulose (adaptado de (37)).

A via bioquímica de produção da BC pelas bactérias, anteriormente mencionadas, é um processo que envolve vários passos e inclui inúmeras enzimas e complexos de proteínas catalíticas e reguladoras (34). A celulose pode ser produzida diretamente a partir da glucose (Glc) ou a partir de metabolitos de outras vias, como o ciclo de Krebs, gluconeogénese e via das pentoses de fosfato (Figura 4). A Glc é transformada em glucose-6-fosfato (G6P), um processo mediado pela hexocinase. Esta é convertida em glucose-1-fosfato (G1P), através da ação da fosfoglucomutase, que seguidamente é transformada em uridina difosfato glucose (UDP-Glc) (34). O último passo desta via é a transformação da UDP-Glc em celulose pela ação da celulose sintase.

biológica, sendo maior para a BC, que é mais rica no alomorfismo Ia, conferindo-lhe uma elevada cristalinidade (cerca de 80 a 90%, em trabalhos de Huang *et al.* (39), enquanto a celulose vegetal apresenta valores entre os 40 a 60%) (40,41). O grau de cristalização da BC também depende do método de produção, sendo menor nas culturas agitadas do que nas culturas estáticas.

A BC possui elevada resistência à tração e módulo de Young, um parâmetro que mede a rigidez de um material sólido, que se deve às fortes ligações de hidrogénio interfibrilares e elevada cristalinidade (3). Este último parâmetro varia com a metodologia escolhida para a produção da BC, já que utilizando culturas agitadas a celulose possui uma forma mais desordenada, que se traduz num módulo de Young ligeiramente mais baixo. A celulose bacteriana embora seja insolúvel em água, tendo em conta a sua estrutura 3D, possui uma área superficial muito elevada, podendo absorver cerca de 200 vezes o seu peso seco em água devido às interações de hidrogénio estabelecidas entre a BC e as moléculas de água (3). De facto, a BC é produzida na forma de um hidrogel com cerca de 99% de água.

As propriedades únicas da BC fazem dela um material promissor com enormes potencialidades de aplicação, que serão discutidas no subtópico seguinte.

2.2.2. Aplicações da nanocelulose bacteriana

Acredita-se que a BC se pode tornar um dos mais importantes produtos de biotecnologia já que, considerando as suas propriedades únicas, pode ser aplicada em diversas áreas (42). Nomeadamente, a BC tem sido explorada em áreas como a indústria alimentar, indústria de papel, fabrico de componentes de áudio, cosmética e biomedicina (Figura 6).

Na indústria alimentar a BC é utilizada como estabilizador, gelificante e espessante em molhos, sobremesas e lacticínios (3,4). Contudo, a aplicação mais conhecida da BC na área alimentar é na preparação de uma sobremesa tradicional filipina, a ‘nata de coco’, obtida a partir da fermentação de bactérias produtoras de BC na presença de água de coco.

Na indústria papelreira a BC pode ser utilizada como aditivo para a obtenção de pasta de papel mais resistente e durável, tendo sido também considerada como uma possível matéria-prima a utilizar na produção de papel eletrónico, uma tecnologia que futuramente poderá ser a base de livros e jornais digitais e papéis de parede dinâmicos (3,43). A celulose bacteriana também se pode aplicar no fabrico de diafragmas para

auscultadores e outros componentes de sistemas de som, já que produz a mesma velocidade de som que um diafragma de alumínio ou titânio e clareza obtida com diafragmas de papel, e possui maior durabilidade, relativamente aos diafragmas de papel (43,44).

A celulose bacteriana tem também aplicações na indústria de cosmética nomeadamente como máscaras para pele seca, e como agente reológico natural em esfoliantes naturais e géis de limpeza (45,46).



Figura 6: Aplicações da celulose bacteriana - produção de 'nata de coco' (a), de diafragmas de sistemas sonoros (b) e de máscaras para a pele (c) (44,45).

Contudo, é na área biomédica que a BC encontra maior potencial, nomeadamente no tratamento de feridas, no fabrico de pele artificial e na substituição de vasos sanguíneos e nervos (34,36). Sendo um material altamente poroso, a BC permite ainda a potencial incorporação de fármacos como a lidocaína e o ibuprofeno, tendo sido estudada a sua aplicabilidade em sistemas de libertação transdérmica controlada de fármacos (34,47,48).

Diversos estudos têm demonstrado as vantagens no uso de membranas de BC no tratamento de feridas, em detrimento dos pensos convencionais, já que estas reduzem a dor local, aceleram o processo de reepitelização, reduzem as taxas de infeção e a formação de cicatrizes (35,49,50). A sua porosidade permite que esta atue como uma barreira física, protegendo o ferimento, e a sua elevada capacidade retenção de água permite a criação de um ambiente húmido para a regeneração correta dos tecidos (51). Uma vez que são altamente conformáveis permitem adaptar-se ao local lesado com alguma facilidade e a sua semi-transparência possibilita o acompanhamento do processo com um menor número de substituições do curativo (27). A BC é ainda biocompatível e não tóxica, e a sua estrutura tridimensional é semelhante a componentes da matriz extracelular, como é o caso do colagénio (36,38).

Apesar de possuírem características atrativas para a cicatrização de lesões, as membranas de BC possuem algumas limitações como carência de propriedades antimicrobianas e falta de transparência ótica, se a membrana possuir uma espessura elevada (4). No entanto, estas limitações podem ser ultrapassadas recorrendo a modificações químicas das membranas, ou por combinação com outros materiais.

2.2.3. Modificação das propriedades das membranas de nanocelulose bacteriana

A modificação de polímeros naturais, como é o caso da BC, é uma estratégia muito utilizada para o desenvolvimento de novos materiais renováveis que apresentem características não existentes no material original, podendo ser aplicados em diversas áreas (48). Estas modificações podem ocorrer na superfície das fibras, alterando características físico-químicas, como a capacidade de retenção de água, que melhora propriedades como a adesão celular das membranas, recorrendo a tratamentos com soluções ácidas (H_2SO_4) ou alcalinas (NaOH), por exemplo (41,48,52,53).

Outra forma de modificação da celulose bacteriana é a incorporação de outros compostos, como é o caso de nanopartículas metálicas, como a prata, que conferem um carácter antimicrobiano às membranas, ou de polissacarídeos, formando compósitos (48,52). Os polissacarídeos podem apresentar diferentes funções como armazenamento (amido, glicogénio) e suporte (celulose, quitina), podendo ainda desempenhar papéis benéficos na saúde humana, já que participam em diversos processos biológicos. A atividade biológica dos polissacarídeos é influenciada pelas suas estruturas química e molecular e encontra-se, também, dependente da sua origem (54).

Uma vez que cerca de 70% da superfície da Terra se encontra coberta por água, o que corresponde a cerca de 90% da biosfera, tem-se verificado, ao longo das últimas décadas, uma tendência crescente para explorar os recursos marinhos do planeta, procurando novas fontes de compostos bioativos (55). Os organismos marinhos representam, assim, uma potencial fonte de compostos de baixo peso molecular e macromoléculas, como é o caso de polissacarídeos como a quitina e o alginato, com elevado potencial biotecnológico, que têm sido explorados sobretudo nas indústrias alimentar, cosmética e farmacêutica.

A quitina, que pode ser encontrada no exosqueleto de crustáceos (caranguejos e camarões), é um polissacarídeo constituído por unidades de *N*-acetilglucosamina (55). A partir da desacetilação parcial da quitina, com soluções alcalinas (p.ex., soluções de

hidróxido de potássio), pode-se obter um outro polissacarídeo, o quitosano, constituído por unidades aleatórias de glucosamina e *N*-acetilglucosamina, unidas por ligações β -(1,4), que podem interagir com outras moléculas biológicas. Por exemplo, as nanofibras de quitina possuem propriedades protetoras da pele, já que reduzem os níveis de TGF- β e estimulam a libertação de citocinas pelos macrófagos (55). Também o quitosano, que pode ser utilizado na forma de cápsulas, hidrogéis, nanofibras e nanopartículas, possui propriedades desejáveis na regeneração de pele já que, além de possuir atividade antioxidante e antimicrobiana, estimula a produção de fibroblastos e inibe a ação das MMPs, acelerando assim o processo de regeneração, como verificado por Lin *et al.* (56) e Dragostin *et al.* (57) no tratamento de feridas em ratinhos (Figura 7) (28,58,59). Assim, este polissacarídeo pode ser incorporado em membranas de BC para regeneração da pele, originando biomateriais compatíveis, biodegradáveis e não tóxicos. Estas membranas podem ainda incluir substâncias inorgânicas como o óxido de zinco (ZnO) que aumenta a atividade antibacteriana do penso e a capacidade de regeneração da pele, como demonstrado, por exemplo, nos trabalhos de Lu *et al.* (60).

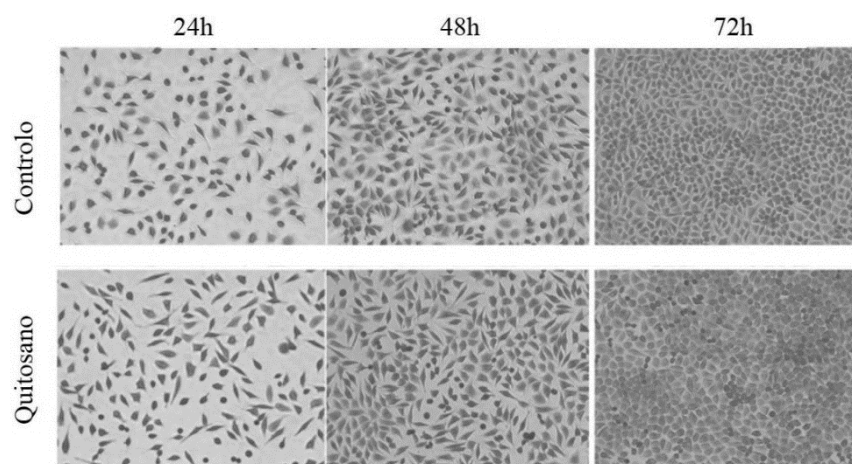


Figura 7: Efeito da adição de quitosano na propagação de fibroblastos de ratinhos após incubação durante 24h, 48h e 72h. É possível verificar um maior crescimento celular nas culturas em que foi utilizado o quitosano, relativamente ao controlo (57).

O alginato é um polissacarídeo linear, constituído por monómeros de ácido β -D-manurónico (M) e de ácido α -L-glucurónico (G) ligados entre os carbonos 1 e 4, que pode ser encontrado na parede celular de algas castanhas, conferindo-lhes flexibilidade (61). Estes monómeros, presentes usualmente na proporção 1:1, podem formar segmentos homogéneos (blocos MM ou GG) ou segmentos mistos (blocos MG ou GM). Para extrair o alginato, a alga é moída e agitada numa solução quente básica, geralmente carbonato de sódio (61). A solução viscosa que se forma é de seguida filtrada e diluída

com uma grande quantidade de água, seguida de nova filtração. O passo seguinte é a precipitação do alginato a partir da solução filtrada, quer como ácido algínico quer como alginato de cálcio, utilizando HCl e CaCl₂, respetivamente (61).

O alginato possui uma variedade de aplicações nas indústrias alimentar e cosmética, devido às suas propriedades estabilizantes, espessantes e gelificantes, e na área biomédica, uma vez que possui elevada atividade antioxidante e é capaz de formar filmes ou hidrogéis na presença de catiões divalentes, podendo ser utilizado como material em curativos de feridas, libertação de fármacos e engenharia de tecidos (55,62). Este polissacarídeo tem sido também incorporado em membranas de BC com algum sucesso, produzindo hidrogéis não tóxicos e biocompatíveis que protegem o ferimento (63), uma vez que, estes compósitos possuem maior espessura e poros de menor dimensão, comparativamente às membranas constituídas unicamente por BC (Figura 8) (48). Estas membranas estimulam ainda a proliferação celular, aumentando os níveis de citocinas libertadas pelos macrófagos (IL-6 e TNF- α) (48,51,58).

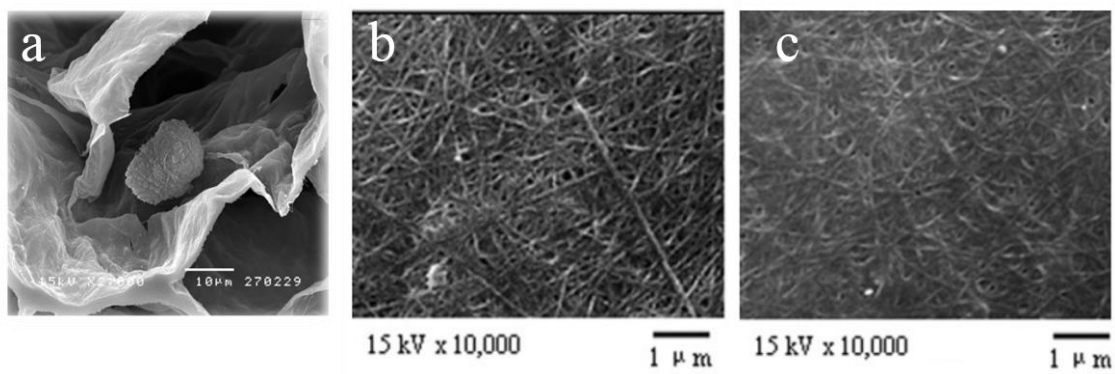


Figura 8: Imagens SEM da aplicação de compósitos de BC e alginato na estimulação do crescimento de culturas de fibroblastos de gengiva humana (a) e comparação da superfície de membranas de BC (b) e BC-alginato (c) (adaptado de (62,63)).

As algas marinhas são, assim, uma boa fonte de polissacarídeos já que, dependendo da espécie, estes representam cerca de 30 a 70% do seu peso seco (61). Para além do alginato acima mencionado existem outros polissacarídeos, como o fucoidano, que estão também presentes em quantidades significativas em algas marinhas e que apresentam propriedades interessantes.

2.3. Fucoïdano

2.3.1. Caracterização do fucoïdano

O fucoïdano (Figura 9) é um polissacarídeo sulfatado presente, em quantidade significativa (cerca de 9 a 22% do peso seco), na parede celular de várias espécies de algas castanhas, como as algas das famílias *Fucaceae* e *Laminariales* (61,64,65). O fucoïdano é um polímero heterogêneo constituído maioritariamente por L-fucose e unidades de fucose sulfatadas, sendo a composição variável consoante a espécie considerada. Contudo, outros monossacarídeos (manose, galactose, glucose e xilose) e ácidos urónicos são também encontrados, o que tornam a estrutura do fucoïdano bastante complexa, sendo as ligações entre os resíduos do tipo (1→3) ou ligações alternadas (1→3) (1→4), embora também tenham sido descritas, na literatura, estruturas de fucoïdano com ligações (1→2) (66). Os grupos sulfato encontram-se, maioritariamente, nas posições C-2 e/ou C-3/ C-4 da fucose.

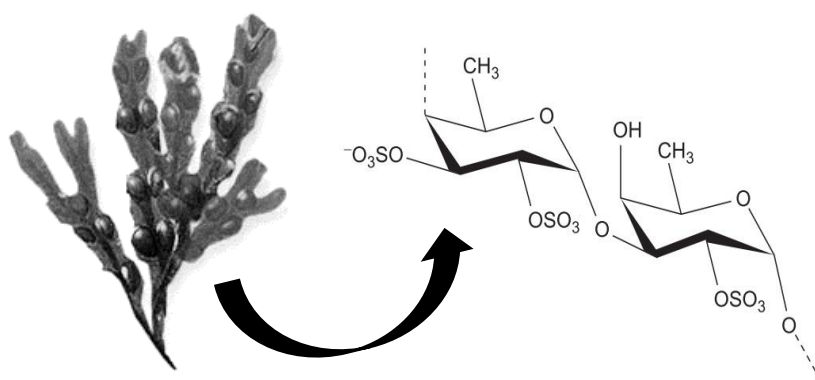


Figura 9: Estrutura de um fucoïdano existente em algas *Fucaceae* (adaptado de (6)).

Tendo em conta a sua variação estrutural, atualmente, o peso molecular (MW) do fucoïdano ainda não é um dado consensual, já que este varia com a espécie de alga e o método de extração utilizados (61). Além disso, o fucoïdano é muitas vezes considerado como uma mistura de várias estruturas com diferentes MW, o que dificulta a sua determinação exata. Alguns investigadores assumem 100 kDa como o MW médio para o fucoïdano, embora existam estudos que indicam valores médios mais elevados (1600 kDa) (61). Alguns trabalhos demonstram que o uso de fucoïdano de baixo peso molecular (LMWF), encontrado naturalmente nas algas ou obtido por despolimerização de cadeias de fucoïdano de MW mais elevado, permite uma amplificação da atividade

biológica do polímero, aumentando assim o interesse no estudo das possíveis aplicações do LMWF (67).

2.3.2. Metodologias de extração

O fucoidano é normalmente extraído de algas secas e maceradas, de forma a obter um melhor rácio área superficial/volume (68). Uma vez que o fucoidano representa cerca de 9-22% da composição das algas torna-se vantajoso realizar um pré-tratamento, para remover outros componentes. Neste pré-tratamento é normalmente utilizada uma mistura de metanol/clorofórmio/água (4:2:1 v/v, por exemplo) que remove lípidos, terpenos e fenóis, evitando a sua co-extração nos passos seguintes e consequente contaminação dos extratos de fucoidano (68).

A extração do fucoidano envolve o tratamento das algas com soluções acídicas quentes (70-100°C) durante várias horas, podendo-se ajustar o pH (2-2,5) para aumentar o rendimento da extração (68,69). A extração acídica é então repetida, e o pH das frações obtidas neutralizado, por exemplo, com hidróxido de sódio (NaOH)(68). Posteriormente, pode ser adicionado cloreto de cálcio (CaCl₂) para precipitar o alginato, aumentando assim o rendimento da extração, embora o uso de soluções acídicas quentes também provoque, em parte, a precipitação deste polissacarídeo. Esta etapa é muitas vezes seguida de precipitação do fucoidano da solução anterior, diluída em água, usando etanol, que remove sais e outras pequenas moléculas que se possam ter ligado ao polissacarídeo de interesse.

Durante os últimos anos têm surgido novos procedimentos de extração de compostos bioativos de algas marinhas, como é o caso do fucoidano (69). A extração assistida por enzimas (EAE), extração assistida por microondas (MAE) e a extração assistida por ultrassons (UAE) são exemplos destas metodologias.

Na EAE é utilizada uma mistura de enzimas que catalisam a degradação da parede celular das algas, permitindo a extração do fucoidano em condições moderadas, que conservam a sua atividade biológica (68,70). Recorrendo a enzimas utilizadas na indústria alimentar, como a α -amilase e celulase, o custo do processo é diminuído, tornando-o económico, comparativamente a outros métodos de extração e, uma vez que esta técnica reduz a quantidade de solventes utilizada, pode-se considerar ambientalmente favorável. Para obter rendimentos elevados de extração é necessário ter em atenção os valores de temperatura e pH ideais das enzimas utilizadas (69). Após incubação na mistura enzimática adequada procede-se à inativação das mesmas,

centrifugação e ajuste do pH, obtendo-se extratos com atividade biológica elevada, já que esta técnica origina, normalmente, polissacarídeos com MW mais baixo (70).

Na técnica de MAE são utilizadas microondas que induzem a vibração de moléculas de água na alga, aumentando a sua temperatura interna, resultando na evaporação da água, e aumento da pressão nas paredes celulares (69,71). As paredes cedem então, libertando para o meio o seu conteúdo intracelular, facilitando a recuperação dos compostos desejados. Esta técnica pode ser realizada em vasos abertos ou fechados, dependendo se a reação se dá à pressão ambiente ou a pressões mais elevadas, respetivamente, (71). A extração de fucoidano recorrendo a MAE foi reportada pela primeira vez por Rodriguez – Jasso *et al.* (72), tendo-se obtido rendimentos elevados com tempos de extração reduzidos, utilizando o programa de digestão mais eficiente (1g alga para 25 mL água, a 120 psi, durante 1 min). Após digestão da alga é necessário utilizar uma solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) para precipitar o alginato, seguida de centrifugação e adição de etanol para precipitar o fucoidano (71–73). Este método mostra ser vantajoso já que permite reduzir a quantidade de solvente utilizada e melhorar a eficiência do processo, utilizando tempos de extração curtos quando comparado à metodologia tradicional, embora os efeitos das microondas na estrutura e atividade biológica do fucoidano sejam ainda desconhecidos.

Na UAE, ondas sonoras de elevada frequência (superior a 20 kHz) são aplicadas ao material (recorrendo a uma sonda ou a um banho de ultrassons) e, quando a pressão exercida excede a resistência à tração do líquido, formam-se bolhas que colapsam (cavitação) (69). A cavitação das bolhas transforma as ondas sonoras em energia mecânica que perturba a estrutura celular, facilitando a saída de compostos de interesse, como é o caso do fucoidano e outros compostos bioativos (68). Esta metodologia de extração é simples e eficiente e, uma vez que opera a temperaturas baixas, é uma boa opção para a extração de compostos termolábeis (69).

Estas novas metodologias podem ser exploradas para a extração de fucoidano e outros compostos bioativos presentes nas algas permitindo que, com o aperfeiçoamento dos protocolos utilizados, seja possível reduzir os custos de recuperação destes compostos e o impacto ambiental das metodologias tradicionais até agora utilizadas.

2.3.3. Propriedades do fucoidano e sua aplicação

O fucoidano possui várias propriedades biológicas interessantes, devido à presença e posição dos grupos sulfato na sua cadeia polissacarídica, sendo estas determinadas por

algumas características como o grau de sulfatação e o MW do composto (6). Assim, fucoidanos com diferentes composições e estruturas possuem diferentes propriedades biológicas e, conseqüentemente, diferentes aplicações.

Uma das propriedades do fucoidano mais estudadas é a atividade anticoagulante, ou seja, o impedimento da formação de coágulos (74). Vários estudos demonstraram que esta atividade pode estar relacionada com a quantidade de sulfato presente, já que fucoidanos com teor elevado destes grupos apresentam elevados efeitos anticoagulantes (66). A posição dos resíduos de sulfato também aparenta ser relevante, sendo os resíduos dissulfatados nas posições C2 e C3 os mais característicos em fucoidanos com esta atividade. Tipicamente, fucoidanos com maior MW apresentam maior atividade anticoagulante, já que cadeias mais longas e com conformação mais estável são necessárias para atuar no mecanismo de anti-coagulação (6,66). A nível molecular o fucoidano interage com fatores de coagulação, impedindo a formação de trombina e consequente deposição do coágulo de fibrina. O fucoidano tem sido considerado como uma alternativa a medicamentos anticoagulantes não naturais, como é o caso da heparina, já que detém elevada atividade anti-trombótica com um menor risco de hemorragia (66).

Outra propriedade interessante do fucoidano é a sua atividade antiviral, quer *in vitro* ou *in vivo*, mostrando este uma citotoxicidade inferior a alguns fármacos antivirais atualmente utilizados (66,75). O fucoidano atua por inibição da replicação de alguns vírus de DNA ou RNA, como o vírus da imunodeficiência humana (HIV). A presença de grupos sulfato, particularmente os presentes nas posições C4, aparenta ser a causa desta atividade antiviral, embora o seu envolvimento na interrupção do mecanismo de replicação viral não esteja ainda bem documentado (66). Assim, uma possível aplicação do fucoidano a nível biomédico seria o seu uso como antiviral, quer através da sua incorporação em biomateriais quer por administração direta, embora nenhuma destas práticas esteja atualmente aprovada por entidades reguladoras de saúde (76).

Ao longo dos últimos anos vários autores têm reportado atividades antitumorais e anti-proliferativas do fucoidano quando aplicado em células de cancro do cólon, próstata, mama, fígado e linfomas, embora o seu mecanismo de atuação ainda não esteja devidamente esclarecido (77–81). De acordo com estes estudos, o fucoidano promove a apoptose de células cancerígenas por supressão das vias de proteína cinases ativadas por mitogénio (MAPK) e PI3K/Akt/mTOR, que são responsáveis pela modulação de várias vias de sinalização, crescimento e subsistência celular, e que se encontram hiperativas

em células tumorais. Assim, o fucoidano mostra-se como um regulador negativo destas vias de sinalização, diminuindo a expressão de vários marcadores associados com o desenvolvimento tumoral, como é o caso de MMPs, VEGF e o fator nuclear *kappa* B (NF- κ B) (76). Apesar da sua atividade antitumoral, o uso de fucoidano como substituto das terapias já existentes não aparenta ser viável podendo este, no entanto, ser utilizado como tratamento auxiliar, já que se pensa que o fucoidano também poderá ser benéfico na redução dos efeitos secundários das metodologias tradicionais, como é o caso da quimioterapia.

Para além das propriedades antitumorais e anti-proliferativas, o fucoidano possui a capacidade de melhorar a atividade imunomodulatória do organismo, através da ativação de células envolvidas na defesa contra corpos estranhos (linfócitos e macrófagos), e consequente expressão de moléculas como citocinas e quimiocinas (74). Esta propriedade pode contribuir para a eficácia no tratamento do cancro, por exemplo, através do uso do fucoidano como imunoterapia de ativação, aumentando a capacidade de defesa do organismo e destruição de células tumorais.

Por fim, num estudo de Kang *et al.* (82), foi avaliado o efeito de polissacarídeos sulfatados de *Ecklonia cava* na atividade anti-inflamatória de células RAW 264.7 estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS), tendo-se verificado que os polissacarídeos utilizados inibiram o efeito do LPS na expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e da ciclooxygenase-2 (COX-2) e, consequentemente, na produção de óxido nítrico (NO) e prostaglandina E2 (PGE2) (74,82). Resultados similares foram obtidos na aplicação de fucoidano de *E. cava* ao modelo *in vivo* peixe-zebra estimulado com LPS, tendo este polissacarídeo diminuído a síntese de ROS e NO, verificando o seu efeito anti-inflamatório (Figura 10) (83). Ao diminuir a expressão destas moléculas envolvidas no processo inflamatório, o fucoidano pode surgir então como um possível agente a aplicar no tratamento de doenças inflamatórias caracterizadas pela degradação descontrolada de componentes da matriz extracelular, como é o caso da artrite reumatóide e de feridas que apresentem complicações na cicatrização (76).

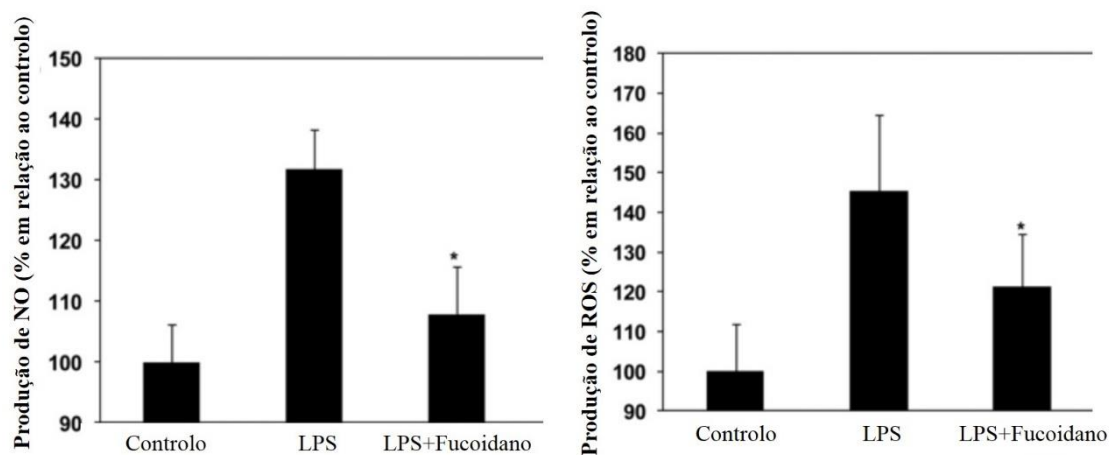


Figura 10: Ação anti-inflamatória do fucoidano, por diminuição da produção de ROS e NO em embriões do modelo peixe-zebra estimulados com LPS, relativamente ao controlo (células sem LPS e fucoidano) (adaptado de (83)).

2.3.4. Fucoidano e o mecanismo de reparação da pele

A combinação das propriedades referidas anteriormente sugere que os polissacarídeos sulfatados provenientes de algas marinhas podem ser considerados para aplicação no tratamento de feridas e regeneração da pele (76). Ao inibir a expressão da iNOS, o fucoidano reduz a inflamação no local lesado, evitando complicações e diminuindo o tempo de cicatrização (83). A atividade imunomodulatória pode auxiliar também a cicatrização de feridas na pele, uma vez que estimula a ação de macrófagos e leucócitos envolvidos no mecanismo, acelerando o processo regenerativo (74). Ao aumentar a velocidade de associação das MMPs aos seus inibidores o fucoidano surge ainda como um modelador da degradação tecidual, podendo desempenhar um papel importante na fase de remodelação (84,85).

Apesar de possuir atividade anticoagulante, esta não foi verificada aquando a administração de fucoidano até 1350 mg/kg PC/dia a ratos, num período de quatro semanas, pelo que o seu uso não apresenta efeitos adversos no que diz respeito a excesso de hemorragias (86). O mesmo estudo demonstrou que, até à dose anteriormente indicada, o fucoidano não apresentava efeitos tóxicos para o organismo. Além disso, uma vez que a formação do coágulo de fibrina acontece nos minutos após a ocorrência da lesão, a aplicação de fucoidano no local lesado não interfere com esta etapa.

Assim, o fucoidano pode ser utilizado como promotor da regeneração tecidual, aplicado, por exemplo, em curativos fabricados a partir de polímeros naturais, como é o

caso da celulose bacteriana. O fucoidano já foi aplicado como aditivo na preparação de hidrogéis de quitosano e alginato e, apesar destes hidrogéis não terem sido caracterizados, foi verificado que a adição deste polissacarídeo estimulou o processo de regeneração em feridas de difícil cicatrização, em ratos (87). No entanto, não foi relatado o uso exclusivo de fucoidano no tratamento de feridas, nem na preparação de compósitos.

Este trabalho tem, assim, como objetivo a extração e incorporação de fucoidano em membranas de BC, sua caracterização e avaliação de parâmetros biológicos no processo de regeneração tecidual em feridas agudas.

3.Procedimento experimental

Neste capítulo são descritos os principais materiais utilizados neste trabalho, assim como os protocolos de extração do fucoídano, preparação e caracterização das membranas compósitas de BC desenvolvidas.

3.1. Materiais

Neste trabalho foram utilizados, como recebidos, glucose (96%, Sigma-Aldrich) extrato de levedura (Himedia), peptona (Himedia) e ácido cítrico anidro (99,6%, Acros Organics). Foram ainda utilizados cloreto de cálcio di-hidratado (para análise, Riedel-de-Haën), glicerol (99,5%, Sigma-Aldrich) e o radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH) (Sigma-Aldrich). Etanol absoluto anidro (para análise, Carlo Erba), metanol (para análise, Chem-Lab) e clorofórmio (99,8%, Fisher Chemicals) foram também utilizados como recebidos.

3.2. Produção de membranas de nanocelulose bacteriana

As membranas de BC foram produzidas segundo o protocolo descrito por Trovatti *et al.* (88) utilizando a estirpe *Gluconacetobacter sacchari* em meio de cultura *Hestrin-Schramm* (HS), contendo 20 g.L⁻¹ de glucose, 5 g.L⁻¹ de peptona, 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 2,7 g.L⁻¹ de Na₂HPO₄ e 1,15 g.L⁻¹ de ácido cítrico, e incubada durante 3 a 5 dias a 30°C, em condições estáticas. Posteriormente, as membranas foram retiradas, lavadas (2 a 3 vezes) com NaOH 0,5 M, a 80-90°C, durante 30 min e finalmente lavadas com água destilada. O branqueamento das membranas foi efetuado com hipoclorito de sódio a 1%, à temperatura ambiente, sendo posteriormente lavadas com água destilada até desaparecimento do cheiro característico. Finalmente, as membranas foram armazenadas em água destilada com ácido acético a 1%, a 4°C, até posterior uso.

3.3. Extração do fucoídano

As amostras de *Fucus vesiculosus* foram recolhidas em janeiro de 2014 de uma população natural em crescimento nos canais de um viveiro de peixes e algas, situado na ria de Aveiro, Portugal. Após recolha, as algas foram sujeitas a um processo de lavagem, utilizando água corrente, para remover sujidade que estas pudessem conter. De

seguida, foram secas na estufa a 40°C, até peso constante, moídas num moinho de café *Moulinex* E211751, e armazenadas num recipiente de plástico fechado à temperatura ambiente.

O procedimento de extração do fucoidano da alga *Fucus vesiculosus*, utilizada neste trabalho, foi adaptado do protocolo referido nos trabalhos de Rodriguez-Jasso *et al.* (84). Num tubo de vidro foi adicionado o resíduo de alga e água destilada (1:25) e esta mistura foi colocada num microondas *Monowave* 300, a 172°C durante 1 min. Posteriormente, a mistura foi colocada num banho de gelo para arrefecimento. Depois, realizou-se uma centrifugação a 4000 rpm durante 5 min e o sobrenadante foi retirado, com um auxílio de uma pipeta de *Pasteur*, para um *Erlenmeyer*.

Ao sobrenadante adicionou-se 60 mL de uma solução de CaCl₂ a 1% (m/m) e deixou-se a repousar a 4°C durante a noite, de forma a precipitar o alginato, um dos principais polissacarídeos presentes nas algas. De seguida, efetuou-se uma filtração, sob vácuo, de forma a separar o alginato precipitado da restante mistura, adicionando, posteriormente, etanol (quádruplo do volume inicial) e deixando a mistura repousar a 4°C durante 8h, para que ocorresse a precipitação do fucoidano. A mistura obtida foi centrifugada (5000 rpm, 20 min, 4°C) e o sobrenadante descartado. Finalmente, o fucoidano (Fuc) foi seco a 40°C, moído e armazenado à temperatura ambiente.

Posteriormente, por forma a reduzir as possíveis contaminações do fucoidano extraído com outros componentes da alga, realizou-se um pré-tratamento a uma parte da alga lavada e moída utilizando, por cada grama de alga, 20 mL de uma mistura de clorofórmio e metanol (2:1 v/v) num gobelé em agitação magnética durante 20 min. De seguida, foi realizada uma centrifugação a 2500 rpm, durante 20 min, à temperatura ambiente e descartado o sobrenadante. O resíduo foi colocado numa estufa a 40°C e moído com o auxílio de um almofariz, tendo sido armazenado à temperatura ambiente. Este resíduo foi sujeito ao protocolo de extração acima descrito, adaptado do referido trabalho de Rodriguez-Jasso *et al.* (84). O fucoidano extraído da alga pré-tratada foi então designado de Fuc_PT.

As percentagens de extração de fucoidano foram calculadas, após quatro extrações em triplicado, usando a seguinte fórmula,

$$\% \text{ Fuc extraído} = \frac{m(\text{Fuc})}{m(\text{FV})} \times 100 ,$$

em que m (*Fuc*) se refere à massa, em gramas, de fucoïdano seco a 40°C obtido no último passo de extração e m (*FV*) à massa, em gramas, da alga *Fucus vesiculosus* pesada para extração por microondas.

3.4. Caracterização do fucoïdano extraído de *Fucus vesiculosus*

Os fucoïdanos extraídos da alga *F. vesiculosus*, *Fuc* e *Fuc_PT* foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier acoplada à reflexão total atenuada (FTIR-ATR). Os espectros de FTIR-ATR foram adquiridos usando um espectrofotômetro FT-IR *Spectrum BX* da *Perkin Elmer* equipado com uma única célula horizontal ATR *Golden Gate*. Foram adquiridos trinta e dois scans na gama dos 4000–600 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} .

O fucoïdano *Fuc_PT* foi ainda sujeito a análise termogravimétrica (TGA) usando um analisador *Shimadzu TGA 50* equipado com uma célula de platina. A amostra foi aquecida em intervalos de 10°C.min⁻¹, desde os 20 até aos 800°C.

3.5. Incorporação do fucoïdano nas membranas de nanocelulose bacteriana

Membranas de BC e fucoïdano foram preparadas, com e sem adição de glicerol, utilizando membranas de BC (com 7 cm de diâmetro) em que foi retirado cerca de 60% do seu peso em água, através de imersão em soluções de fucoïdano a 15%, relativamente à massa de nanocelulose bacteriana na membrana, e fucoïdano a 15% e glicerol 5% (relativamente ao volume total de solução), como indicado na Tabela 1, até absorção completa à temperatura ambiente. As membranas foram colocadas na estufa, a 40°C, durante a noite, sendo armazenadas num exsiccador até posterior uso.

Tabela 1: Composição das membranas BC/*Fuc*15 e BC/*Glic*/*Fuc*15. %^a percentagem em relação à massa de BC na membrana e %^b percentagem relativamente ao volume de solução.

Membranas	Fucoïdano		Glicerol	
	(% ^a)	mg.mL ⁻¹	(% ^b)	mg.mL ⁻¹
BC/<i>Fuc</i>15	15	3,73	-	-
BC/<i>Glic</i>/<i>Fuc</i>15	15	3,50	5	63

Foi efetuado um ensaio preliminar de saída de fucoïdano da membrana BC/Glic/Fuc15 na qual um fragmento de membrana seca foi retirado, pesado e colocado num porta-amostras fechado com 25 mL de água destilada, durante 3-4 dias. Após esse tempo de imersão o pedaço de membrana foi colocado a secar numa estufa, a 40°C, e posteriormente pesado. A percentagem de fucoïdano removida da membrana foi calculada segundo a seguinte fórmula:

$$\text{Fucoïdano retirado} = \frac{m(\text{membrana com fucoïdano}) - m(\text{membrana após imersão})}{m(\text{membrana com fucoïdano})} \times 100$$

Após este ensaio preliminar foram preparadas as membranas finais de BC e fucoïdano, segundo o procedimento descrito anteriormente, com diferentes quantidades de fucoïdano e glicerol, conforme indicado na Tabela 2. As membranas de BC foram imersas, à temperatura ambiente, até à absorção completa da solução e colocadas na estufa, a 40°C, durante a noite. As membranas secas foram armazenadas num exsiccador até posterior uso.

Tabela 2: Composição das membranas BC, BC/Glic e BC/Glic/Fuc. %^a percentagem em relação à massa de BC na membrana e %^b percentagem relativamente ao volume de solução.

Membranas	Fucoïdano		Glicerol	
	(% ^a)	mg.mL ⁻¹	(% ^b)	mg.mL ⁻¹
BC	-	-	-	-
BC/Glic	-	-	5	63
BC/Glic/Fuc5	5	1,26	5	63
BC/Glic/Fuc10	10	2,49	5	63
BC/Glic/Fuc15	15	3,50	5	63

3.6. Caracterização das membranas de BC-fucoïdano

Todas as membranas desenvolvidas neste trabalho foram caracterizadas utilizando espectroscopia de UV-vis, espectroscopia de infravermelho (FTIR-ATR), microscopia eletrónica de varrimento (SEM), ensaios mecânicos, análise termogravimétrica (TGA) e absorção de água. Os resultados foram sujeitos a análise de variância de fator único (ANOVA) para determinar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre valores médios.

Os espectros de UV-vis foram adquiridos no intervalo 250-850 nm, recorrendo a um espectrofotômetro de UV-vis *Jasco V-560*, em modo de resposta lenta, com largura de banda de 5,0 nm e velocidade de leitura de 100 nm.min⁻¹, utilizando como referência uma amostra de sulfato de bário (BaSO₄).

Os espectros de FTIR-ATR foram adquiridos usando um espectrofotômetro FT-IR *Spectrum BX* da *Perkin Elmer* equipado com uma única célula horizontal ATR Golden Gate. Foram adquiridos trinta e dois scans na gama dos 4000–600 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹.

As micrografias de SEM da superfície e corte transversal das membranas nanocompósitas de BC foram obtidas com o equipamento SU-70 *Hitachi*, operado a 4 kV. As amostras foram previamente depositadas num suporte de aço e recobertas com carbono.

As propriedades mecânicas foram determinadas usando uma máquina de teste *Instron 5966*, em modo de tração, a uma velocidade de 10 mm.min⁻¹, recorrendo a uma célula de carga de 500 N. Os espécimes foram recortados em tiras retangulares (50 por 10 mm²) e equilibrados previamente à temperatura ambiente num exsiccador. As medições foram efetuadas em quadruplicado para cada membrana e o valor médio foi, então, calculado.

As análises termogravimétricas (TGA) foram efetuadas usando um analisador *Shimadzu TGA 50* equipado com uma célula de platina. As amostras foram aquecidas em intervalos de 10°C.min⁻¹, desde os 20 até aos 800°C.

A absorção de água das membranas foi determinada por imersão de espécimes com 1 cm² em água destilada, à temperatura ambiente, durante 24h. As amostras foram retiradas da água aos tempos 0,5, 8 e 24h após imersão e de seguida secas com papel e o seu peso húmido medido (W_w). A absorção de água foi calculada como $W(\%) = \frac{(W_w - W_0)}{W_0}$, onde W_0 é o peso inicial da amostra seca e W_w o peso húmido da amostra aos tempos 0,5, 8 ou 24h após imersão do espécime.

3.7. Avaliação da atividade biológica do extrato de fucoïdano

Para determinar a atividade biológica do fucoïdano extraído de *F. vesiculosus* foram realizados testes, avaliando parâmetros como a atividade antioxidante, citotoxicidade e atividade anti-inflamatória.

3.7.1. Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada medindo a capacidade do fucoidano neutralizar o radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH). Para a reação foi preparada uma solução de fucoidano 5 mg.mL⁻¹ da qual foram retirados diferentes volumes (100, 150, 200, 400, 500, 600 e 700 µL) para um tubo de vidro e completado o volume até 1 mL com água destilada. A cada um destes tubos foi adicionado 1,750 mL de metanol e 250 µL de solução de DPPH, 0,34 mg.mL⁻¹, também preparada em metanol. O controle foi preparado substituindo o volume de amostra por água destilada. As misturas foram agitadas e incubadas no escuro, à temperatura ambiente, durante 30 minutos. De seguida, foram determinadas as absorvâncias a 517 nm e calculadas as atividades antioxidantes para cada amostra, expressas através da percentagem de inibição do DPPH, pela seguinte fórmula, em que AA e AC correspondem à absorvância a 517 nm da amostra e do controle, respetivamente:

$$Inibição\ do\ DPPH\ (\%) = 1 - \left(\frac{AA}{AC}\right) \times 100$$

3.7.2. Determinação da viabilidade celular

Para determinação da viabilidade celular foi utilizada uma linha celular de macrófagos de ratinhos leucémicos, RAW 264.7 (*American Type Culture Collection*: TIB-71) em meio de cultura de *Eagle* modificado de *Dulbecco* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal de bovino (FBS), 100 U.mL⁻¹ de penicilina e 100 µg.mL⁻¹ de estreptomicina, a 37°C, em atmosfera humidificada de 95% ar e 5% CO₂. As células foram inspecionadas para alterações morfológicas por observação por microscópio, e realizadas subculturas de dois em dois dias até passagem 25.

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de resazurina, em que 5x10⁴ células por poço foram expostas a 12,5, 25, 50, 100 e 200 µg.mL⁻¹ de fucoidano, numa placa de 96 poços, durante 24 horas (89). Duas horas antes do término da exposição foi adicionada uma solução de resazurina a cada poço, até concentração final de 50 µM. Foram lidas as absorvâncias a 570 e 600 nm num leitor de microplacas *Synergy* (*Biotek*) e calculada a percentagem de viabilidade celular segundo a seguinte fórmula:

$$Viabilidade\ (\%) = \frac{(A570 - A600)_{amostra}}{(A570 - A600)_{controle}} \times 100$$

3.7.3. Determinação da atividade anti-inflamatória

A produção de óxido nítrico (NO) foi medida pela acumulação de nitrito nos sobrenadantes da cultura utilizada anteriormente para avaliação da viabilidade celular, usando a reação colorimétrica com reagente de *Griess*. As células foram plaqueadas com uma densidade de 3×10^5 células por poço, numa placa de 48 poços, estabilizadas durante 12 horas e posteriormente expostas a 12,5, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de fucoidano. Algumas amostras foram preparadas com lipopolissacarídeo (LPS) para verificar a forma como a exposição a fucoidano afeta a capacidade de os macrófagos responderem a estímulos pro-inflamatórios. Para tal, 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de LPS foi adicionado após 1h de exposição ao fucoidano e as células incubadas durante 24h. Para a medição de NO, 100 μL de sobrenadantes da cultura foram recolhidos e diluídos com igual volume de reagente de *Griess* (0,1% (m/v) dicloridrato de N-(1-naftil) -etilenodiamina e 1% (m/v) sulfanilamida, contendo 5% (m/v) H_3PO_4) durante 30 minutos, no escuro. Foi lida a absorvância a 550 nm, usando um espectrofotómetro *Synergy HT*, e calculada a concentração de NO (μM) recorrendo a uma reta de calibração, com equação $A_{550}(\text{nm}) = 0,0104 [\text{NO}] + 0,0397$ ($r^2 = 0,9982$).

4. Resultados e discussão

Este capítulo centra-se na apresentação e discussão dos resultados obtidos ao longo deste trabalho, comparando-os, quando possível, com resultados encontrados na literatura.

4.1. Extração do fucoidano de *Fucus vesiculosus*

A *F. vesiculosus* é uma alga castanha que se encontra predominantemente no Mar Báltico e em zonas costeiras de alguns países europeus, como é o caso de Portugal, ilhas do Atlântico e ainda algumas zonas costeiras norte-americanas (90). Esta espécie apresenta um elevado teor de fucoidano (9 a 22%, relativamente ao peso seco) quando comparada com outras espécies de algas (65). Esta percentagem varia consoante a época de colheita, uma vez que na época de abril a setembro as algas estão expostas a uma maior quantidade e intensidade de luz solar, e, por conseguinte, a uma maior destruição dos componentes celulares por parte dos raios ultravioleta (UV), dando-se, portanto, um aumento gradual da composição em polissacarídeos como forma de aumentar a estabilidade da parede celular das algas.

Esta alga foi escolhida para a realização deste trabalho por possuir elevados teores de fucoidano e por ser uma alga existente na costa portuguesa, o que facilitou a sua colheita. Por outro lado, a seleção e utilização desta alga contribuirá certamente para a exploração dos recursos naturais do nosso país.

Numa primeira fase procedeu-se à extração de fucoidano da alga previamente seca e moída utilizando uma metodologia de extração assistida por microondas adaptada do protocolo descrito por Rodriguez-Jasso *et al.* (91). Esta metodologia de extração por microondas foi aplicada já que, por um lado, diminui o tempo de digestão da alga quando comparada com o método tradicional e, por outro, utiliza cloreto de cálcio, que permite extrair fucoidano com teor de fucose mais elevado que a extração enzimática (92), aumentando assim o potencial de extração dos polissacarídeos sulfatados.

Foram obtidas percentagens de extração de fucoidano de *F. vesiculosus* na gama dos 4,8 e os 12,9%, com um valor médio de $11,6 \pm 4,4\%$, observando-se alguma variabilidade nos valores da quantidade de fucoidano extraído nos vários ensaios, relacionadas obviamente com a heterogeneidade da amostra.

Para além da variabilidade existente nas percentagens de extração do fucoidano da alga, através da observação a olho nu do extrato após moagem (Figura 11), verificou-se

a presença de partículas de diferentes granulometrias, umas com uma cor mais escura que outras, sugerindo a presença de impurezas no fucoídano extraído. Assim, podemos inferir que com a digestão estão a ser co-extraídos outros compostos existentes nas algas, como é o caso de fenóis e alguns pigmentos fotossintéticos.



Figura 11: Fucoídano extraído utilizando o método de extração assistido por microondas (MAE).

Atendendo a estas observações houve necessidade de adaptar a metodologia utilizada e, assim, decidiu-se aplicar um passo de pré-tratamento à alga moída, utilizando uma mistura de metanol e clorofórmio, de forma a remover alguns destes compostos (71). De seguida, foi utilizada a mesma metodologia de extração para o extrato de alga pré-tratada (FVT) e calculadas as percentagens de extração, para as extrações realizadas, em triplicado.

Neste caso, foram obtidas percentagens de extração entre os 13,1 e os 16,0%, portanto mais similares entre si, contrariamente ao verificado nas extrações onde foi usada a alga sem pré-tratamento. Tendo presente a percentagem teórica de fucoídano existente nas algas desta espécie (9-22%) verifica-se que estas percentagens de extração de FVT se encontram dentro deste intervalo, embora, atendendo à média dos resultados obtidos ($14,8 \pm 1,0\%$), as percentagens de extração de fucoídano foram inferiores às reportadas por Rodriguez-Jasso *et al.* (91), utilizando a técnica de digestão com recurso a microondas ($18,2 \pm 1,4\%$) (65,91). Esta diferença nos valores obtidos pode dever-se primariamente, ao facto do protocolo de Rodriguez-Jasso *et al.* (91) não apresentar um passo de pré-tratamento da alga colhida, mas também à diferença do local e época de recolha da alga, sendo que a usada por Rodriguez-Jasso *et al.* (91) foi colhida em maio na Praia do Norte, Portugal e a utilizada neste trabalho foi colhida em janeiro, na ria de Aveiro, Portugal, possuindo então um menor teor de açúcares e, por conseguinte, um menor teor de fucoídano passível de ser extraído.

Ao comparar, a olho nu, o fucoidano obtido por extração da alga normal (Fuc) e o obtido por extração da alga pré-tratada (Fuc_PT) podemos verificar que este último apresenta uma granulometria e cor mais homogênea (Figura 12), o que sugere que o pré-tratamento com clorofórmio e metanol foi eficaz na remoção de alguns compostos presentes em *F. vesiculosus* que são co-extraídos com o fucoidano.



Figura 12: Comparação entre o fucoidano obtido a partir da *F. vesiculosus* sem (Fuc) e com pré-tratamento (Fuc_PT).

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica importante para comprovar a presença de certos grupos funcionais numa molécula a partir do conjunto característico de bandas presentes num espectro (93,94). Recorrendo à reflexão total atenuada (ATR), uma técnica de amostragem que pode ser acoplada a FTIR, podemos efetuar a análise direta de amostras sólidas sem necessidade de preparação prévia, o que é vantajoso para a análise não destrutiva das amostras (93,94). Foram adquiridos os espectros de FTIR-ATR do fucoidano extraído da alga, com e sem pré-tratamento, respetivamente, encontrando-se estes representados na Figura 13.

Pode-se observar um padrão semelhante entre as duas amostras, salientando algumas bandas características que permitem classificá-las como polissacarídeos sulfatados (fucoidanos). A cerca de 3358 cm^{-1} observa-se uma banda forte que corresponde ao alongamento dos grupos hidroxilos, tipicamente presentes nas unidades monoméricas que constituem os fucoidanos (95). Similarmente, por volta de 1594 e 1416 cm^{-1} encontram-se as vibrações assimétricas e simétricas, respetivamente, dos grupos carboxílico que podem existir em alguns monómeros deste composto, como é o caso dos ácidos urónicos. Entre 1260 e 1220 cm^{-1} surgem as bandas correspondentes aos grupos S=O presentes no fucoidano, características dos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas (72,96). Por volta de 1026 cm^{-1} observa-se a banda característica das

ligações glicosídicas (C–O–C) e a banda a cerca de 820 cm^{-1} é atribuída a substituições complexas das unidades 4-sulfato e 6-sulfato nos monossacarídeos (95,97).

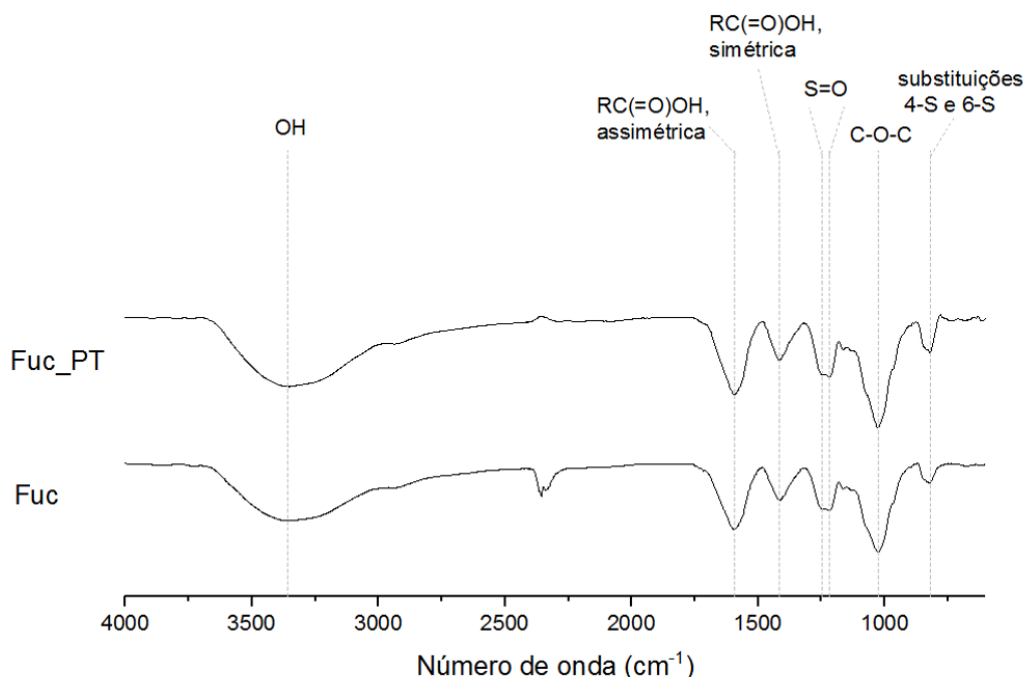


Figura 13: Espetros de FTIR-ATR do fucoidano extraído de *Fucus vesiculosus* com e sem pré-tratamento (Fuc_PT e Fuc, respetivamente).

Apesar de não se verificarem diferenças nos espetros de FTIR-ATR, o fucoidano resultante da extração de algas pré-tratadas apresenta ainda uma coloração verde-acastanhada que indica a presença de alguns pigmentos, como é o caso da fucoxantina, responsável pela cor acastanhada das algas desta família (98). Contudo, por aparentar ser mais puro, o fucoidano Fuc_PT foi o escolhido para incorporação nas membranas de BC.

4.2. Incorporação de fucoidano proveniente de *Fucus vesiculosus* em membranas de nanocelulose bacteriana

Numa primeira abordagem procedeu-se à incorporação de uma solução aquosa de fucoidano (15% m/m) numa membrana de BC, deixando-se a membrana nesta solução até à sua absorção completa e posteriormente procedeu-se a secagem na estufa. Esta abordagem resultou numa membrana (BC/Fuc15) homogénea com uma tonalidade acastanhada, característica da coloração do fucoidano extraído (Figura 14), sendo uma

primeira indicação da distribuição homogênea do fucoidano na estrutura tridimensional da BC.



Figura 14: Comparação entre a membrana de nanocelulose bacteriana (BC) (em cima) e a membrana de nanocelulose bacteriana e fucoidano a 15% (BC/Fuc15) (em baixo).

Uma vez que a membrana permanece translúcida, a coloração desta não será aparentemente um problema pois será possível observar os ferimentos na pele através da mesma. Pelo contrário, a cor acastanhada ténue das membranas compósitas até poderá ser benéfica já que, tendo em conta a sua aplicação como curativo, poderá disfarçar a presença da membrana no local lesado, sugerindo até mesmo a sua aplicação como curativo discreto para doenças da pele, como é o caso da psoríase. Por outro lado, a cor acastanhada das membranas remete para a presença de pigmentos da alga, como a fucoxantina, um carotenoide que apresenta atividades antioxidante e anti-inflamatória, podendo assim auxiliar o mecanismo de regeneração da pele (98).

Contudo, a membrana BC/Fuc15 mostrou-se bastante quebradiça, o que é uma desvantagem tendo em conta a potencial aplicação na regeneração de feridas e a sua aplicação por vezes em zonas mais irregulares. Assim, procedeu-se à incorporação de glicerol, um plastificante bastante comum para materiais de natureza polissacarídica, de forma a aumentar a maleabilidade das membranas de BC e fucoidano. Este plastificante foi já incorporado, com sucesso, em membranas de BC com diversos fármacos modelo, como verificado nos trabalhos de Silva *et al.* (99), sendo uma concentração de 5% a indicada nesses casos como suficiente para produzir uma membrana maleável. Além disso, a inclusão de glicerol nas membranas pode ser benéfico já que, para além de

aumentar a maleabilidade, resulta num efeito hidratante da pele que é um fator fundamental no tratamento de diversas doenças da pele (47).

Uma vez que o fucoidano é solúvel em água foram realizados alguns testes preliminares de saída deste polissacarídeo da membrana BC/Glic/Fuc15. Após estes testes, realizados em triplicado, verificou-se que a percentagem de libertação do fucoidano de membranas com glicerol (5%) e fucoidano (15%) rondava os $58,6 \pm 8,1\%$. De facto, esta libertação parcial do composto poderá constituir uma vantagem, uma vez que o fucoidano proveniente de algas castanhas apresenta atividade anti-inflamatória e antibacteriana e a sua libertação direta para a zona ferida da pele poderá estimular mais eficientemente o processo de cicatrização.

Após estes ensaios preliminares, foram preparadas as membranas BC, BC/Glic, BC/Glic/Fuc5, BC/Glic/Fuc10 e BC/Glic/Fuc15 (Figura 15), em duplicado, com concentração de fucoidano variável (0, 5, 10 e 15% m/m) e glicerol (0 ou 5% v/v), (Tabela 2), e analisadas em termos de estrutura, composição, estabilidade térmica, propriedades mecânicas e capacidade de absorção de água.

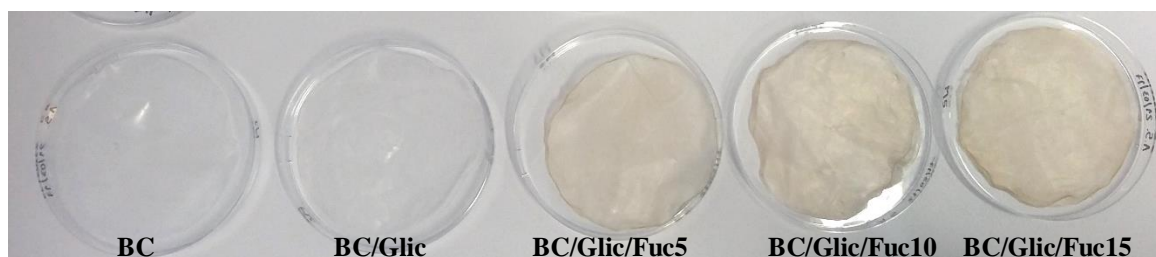


Figura 15: Membranas de BC, BC/Glic e BC/Glic/Fuc com diferentes quantidades de fucoidano, após secagem na estufa.

4.3. Caracterização das membranas

Com o avanço da ciência e da tecnologia nos últimos anos têm sido desenvolvidos diversos materiais inovadores para diferentes aplicações, nomeadamente para aplicação na área biomédica, com especial foco na engenharia e regeneração de tecidos e órgãos (100). Estes biomateriais criados em laboratório permitem ultrapassar desafios e barreiras que eram considerados intransponíveis, aproximando-se cada vez mais do objetivo maior desta área que é melhorar a qualidade de vida, em geral, da população. No entanto, não é só o desenvolvimento destes biomateriais que é necessário, mas também a sua caracterização detalhada, uma vez que atendendo à sua aplicação na área

da saúde é importante conhecer o comportamento do material e se este se encontra de acordo com as normas reguladas (100). Assim, esta subsecção irá focar-se na caracterização das membranas compósitas desenvolvidas neste trabalho, recorrendo a uma miríade de técnicas para auxiliar a compreensão das suas propriedades e possível aplicação na regeneração da pele. Dado o carácter inovador deste trabalho e atendendo ao facto que o único artigo que faz menção, até à data deste relatório, de um compósito contendo fucoidano não possui caracterização das membranas, os resultados obtidos nesta secção serão comparados com compósitos de BC e outros polissacarídeos e proteínas utilizados na área biomédica (87).

4.3.1. Espectroscopia de UV-vis

A espectroscopia de refletância difusa é uma técnica muito utilizada para avaliar a transparência de vários materiais compósitos no espectro visível (101,102). Uma vez que se deu alteração de cor das membranas de BC com o aumento do teor de fucoidano adicionado (Figura 15) procedeu-se à análise das membranas de BC/Fuc desenvolvidas neste trabalho por espectroscopia de UV-vis, encontrando-se os espectros traçados na Figura 16.

As membranas de BC/Glic/Fuc apresentam um padrão similar entre si, podendo-se observar uma única banda, com baixas percentagens de transmitância na região do UV-C (100-280 nm), a 260 nm, sofrendo alargamento com o aumento da concentração de fucoidano presente na membrana, o que mostra o potencial efeito protetor destes polissacarídeos sulfatados contra a radiação UV (65,103). Por outro lado, não se verificam bandas na região do visível (400 a 750 nm) podendo confirmar-se que as membranas desenvolvidas neste trabalho possuem alguma translucidez na região do visível, mesmo aquando a introdução de fucoidano na matriz de BC. Aproximando-nos do extremo do espectro visível, a 400 nm, verificamos uma grande diminuição da transmitância com o aumento de concentração de fucoidano, tendo a percentagem de BC/Glic/Fuc15 diminuído para cerca de metade, quando comparada com a BC.

Estes resultados mostram claramente que estas membranas possuem as propriedades óticas necessárias para garantir o acompanhamento visual do tratamento de feridas da pele, para além de, atendendo ao efeito protetor do fucoidano, protegerem o local danificado da radiação UV.

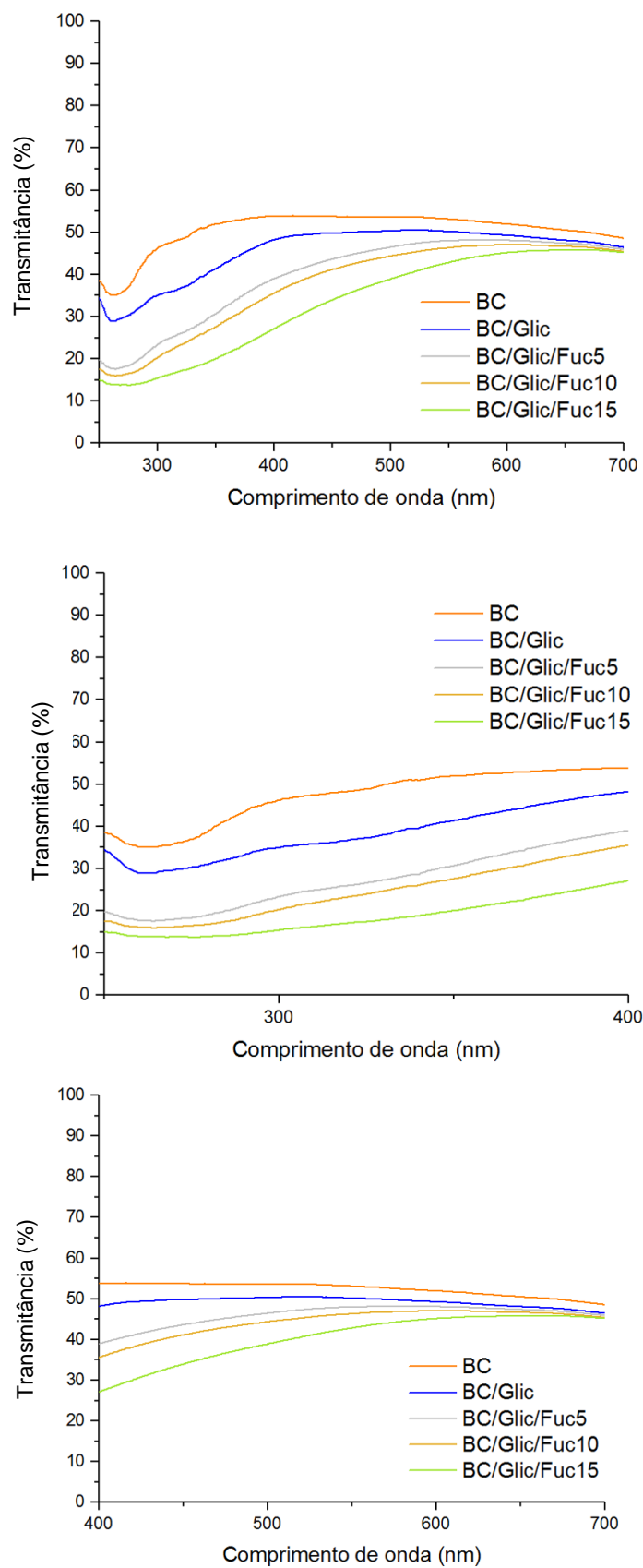


Figura 16: Espectros de UV-vis das membranas BC, BC/Glic e BC/Glic/Fuc, entre 250-700 nm (em cima), e com aproximação na região do ultravioleta (centro) e do visível (em baixo).

4.3.2. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier acoplada a reflexão total atenuada (FTIR-ATR)

A análise por FTIR foi utilizada para caracterizar as membranas de BC, e em particular confirmar a presença de glicerol e fucoídano incorporados e averiguar a existência de diferenças nos espectros de cada uma delas. A técnica de FTIR-ATR tem vindo a ser usada para a caracterização de membranas de BC e compósitos com aplicação na área da medicina e permite, de uma forma simples e rápida, verificar a inclusão de compostos na matriz escolhida (56,58). Assim, através da análise das bandas dos espectros de FTIR-ATR das membranas BC, BC/Glic e BC/Glic/Fuc é expectável identificar bandas características dos grupos funcionais dos componentes das membranas (BC, glicerol e fucoídano).

Na Figura 17 encontram-se representados os espectros de FTIR-ATR das membranas BC, BC/Glic e BC/Glic/Fuc, na gama dos 4000 aos 600 cm^{-1} , onde se encontram identificadas algumas das bandas mais relevantes. Embora já tenha sido discutido o espectro de Fuc_PT, este encontra-se também representado para comparação com os compósitos desenvolvidos neste trabalho.

A BC apresenta bandas a 3332 e 2906 cm^{-1} atribuídas, respetivamente, ao alongamento dos grupos hidroxilo e ao alongamento dos grupos CH_2 , sendo estes valores concordantes com os obtidos em análises de BC produzida por bactérias *Gluconacetobacter* em meio HS, em estudos de Gayathry *et al.* (104) e Silva *et al.* (99). Por volta de 1160, 1096 e 1030 cm^{-1} surgem bandas atribuídas à possibilidade de funcionalidades C–O–C na BC, ao alongamento das ligações C–O e à presença de ligações glicosídicas, respetivamente (104,105). Podem ainda ser identificadas vibrações de flexão fora do plano correspondentes aos grupos CH e C–OH, nas zonas de 870-900 cm^{-1} e 665-670 cm^{-1} , respetivamente, observadas na parte final do espectro da Figura 17.

A membrana BC/Glic também apresentou bandas a 3332 e 2906 cm^{-1} , associadas com os grupos OH e CH, respetivamente, presentes tanto na BC como no glicerol (99). A banda característica da vibração C–O, típica dos álcoois, encontra-se presente a 1096 cm^{-1} , sendo também comum ao alongamento das ligações C–O na BC. Todas as restantes bandas acima identificadas para a BC pura encontram-se representadas no espectro desta membrana.

É expectável que as membranas BC/Glic/Fuc possuam bandas características tanto da BC, como do glicerol e do fucoídano. De facto, podemos verificar a presença de

todas as bandas anteriormente mencionadas, referentes à BC e ao glicerol, bem como a presença de bandas a 1594 e 1416 cm^{-1} , atribuídas a vibrações assimétricas e simétricas, respetivamente, dos grupos carboxílico que podem estar presentes em alguns monossacarídeos constituintes do fucoidano. A cerca de 1206 cm^{-1} surge um pico ténue que, apesar de um pouco desviado do intervalo 1260-1220 cm^{-1} , corresponde aos grupos S=O do fucoidano, confirmando assim a sua incorporação nas membranas de BC (96). A banda a 1030 cm^{-1} poderá também ser relacionada, como mencionado anteriormente, com as ligações glicosídicas presentes entre monossacarídeos, quer dos polissacarídeos sulfatados presentes nas membranas BC/Glic/Fuc, quer da BC que serve de reforço a todas as amostras (95). A banda indicada a 854 cm^{-1} pode ainda ser atribuída a substituições complexas das unidades 4-sulfato e 6-sulfato nos monossacarídeos constituintes do fucoidano justificando, mais uma vez, a sua bem sucedida incorporação nas membranas BC/Glic/Fuc (96,97).

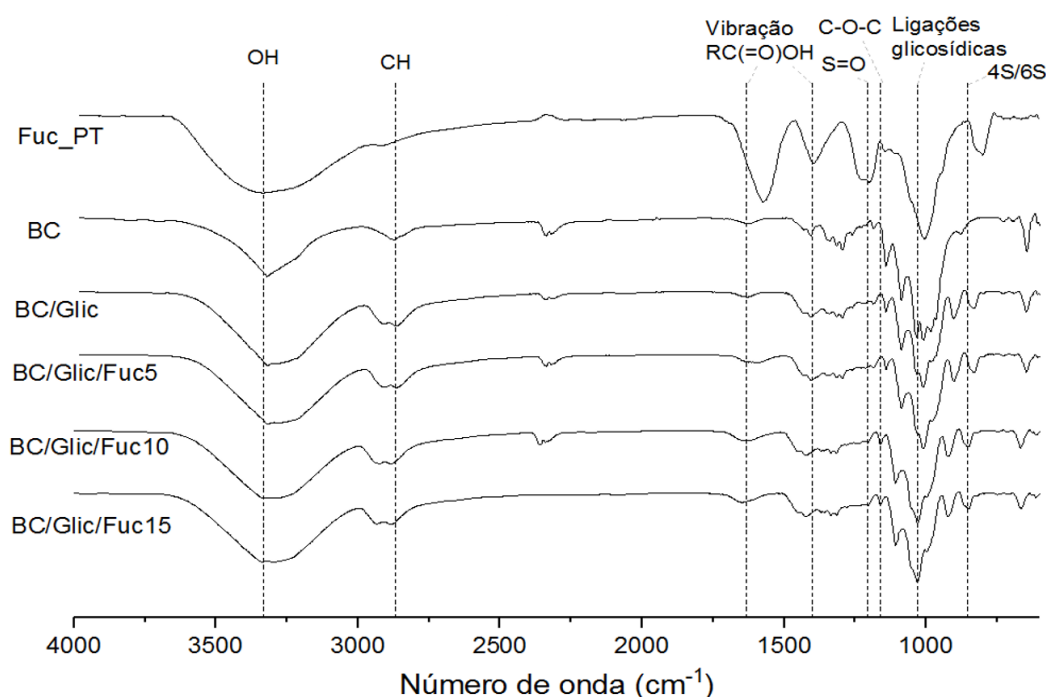


Figura 17: Espectros de FTIR-ATR de fucoidano pré-tratado (Fuc_PT) e das membranas BC, BC/Glic e BC/Glic/Fuc.

4.3.3. Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)

O SEM é um tipo de microscopia eletrónica que produz imagens por varrimento da superfície de uma amostra com um feixe de eletrões localizado (106). Os eletrões interagem com os átomos da amostra, produzindo vários sinais que contém informação

acerca da topografia da superfície (textura), composição química, estrutura cristalina e orientação dos constituintes da amostra. Esta é uma técnica bastante usada na caracterização de materiais já que combina a simplicidade da preparação de amostras com o desempenho e flexibilidade de microscópios eletrônicos sofisticados (106). A Figura 18 e a Figura 19 apresentam as micrografias de SEM da superfície (vista superior) das membranas BC, BC/Glic e BC/Glic/Fuc e a Figura 20 as respectivas vistas transversais na zona de quebra.

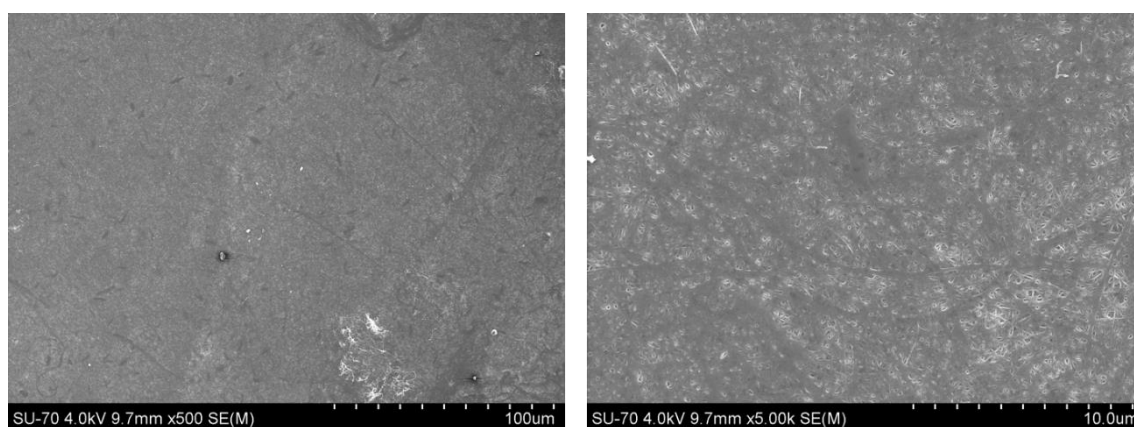


Figura 18: Micrografias de SEM de BC a diferentes ampliações.

As micrografias de SEM de BC confirmam a sua estrutura tridimensional bem organizada, assim como as fibrilas que a constituem, de dimensão nanométrica, organizadas aleatoriamente e formando espaços vazios entre si, normalmente designados por poros (36,38,88). Uma estrutura similar pode ser observada na Figura 19 para a membrana BC/Glic, embora seja possível verificar a existência de um maior número de poros na sua superfície, devido à adição de glicerol, já que este plastificante é retido entre as fibrilas de BC, reduzindo as interações intermoleculares e aumentando a distância entre elas, originando um maior número de espaços vazios (47). Por outras palavras, a presença de glicerol diminui o colapso da estrutura tridimensional da nanocelulose com a secagem da membrana, sendo, por isso, a membrana constituída unicamente por BC mais compacta que a da membrana BC/Glic (99).

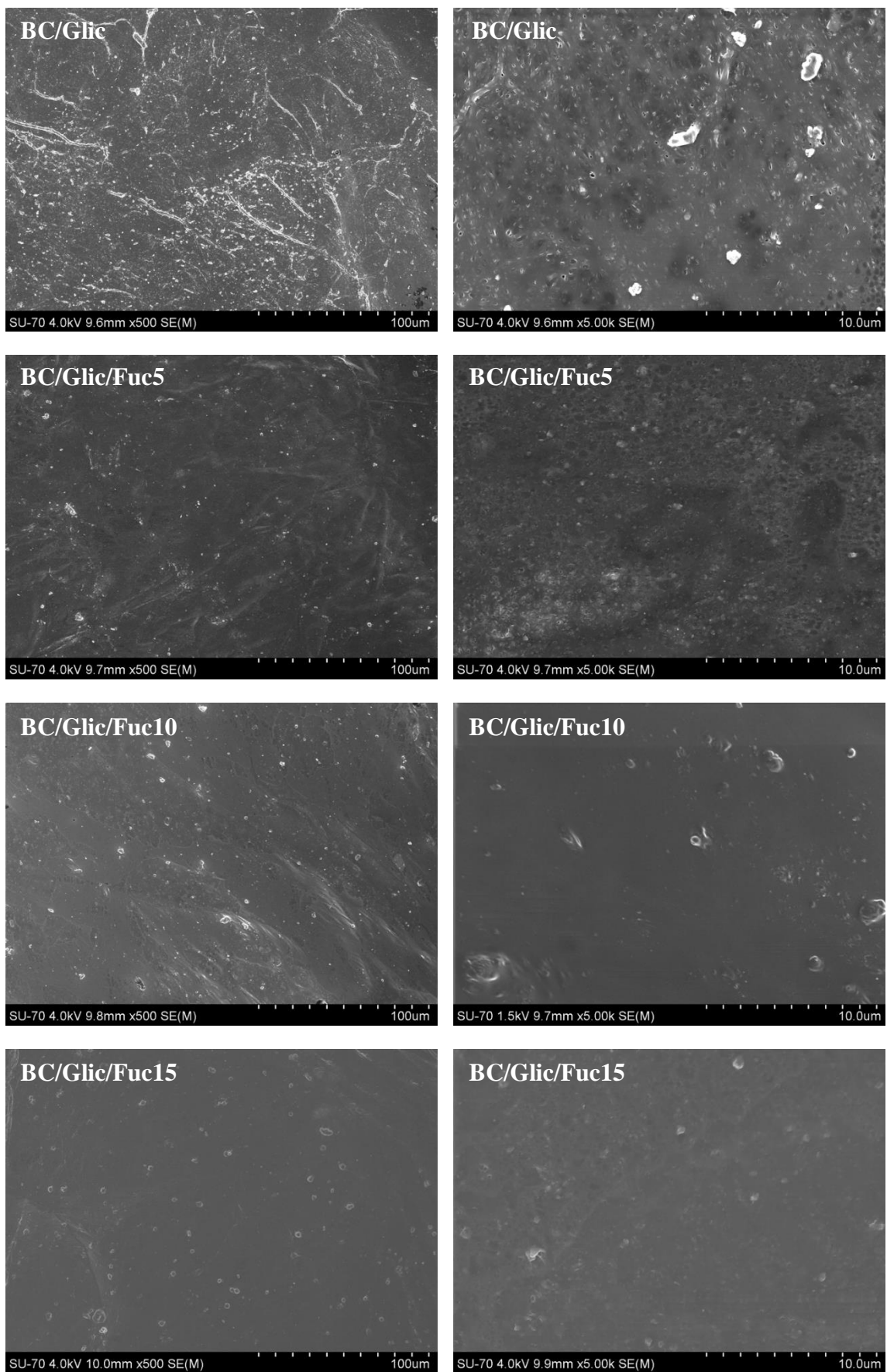


Figura 19: Micrografias de SEM de BC/Glic e BC/Glic/Fuc.

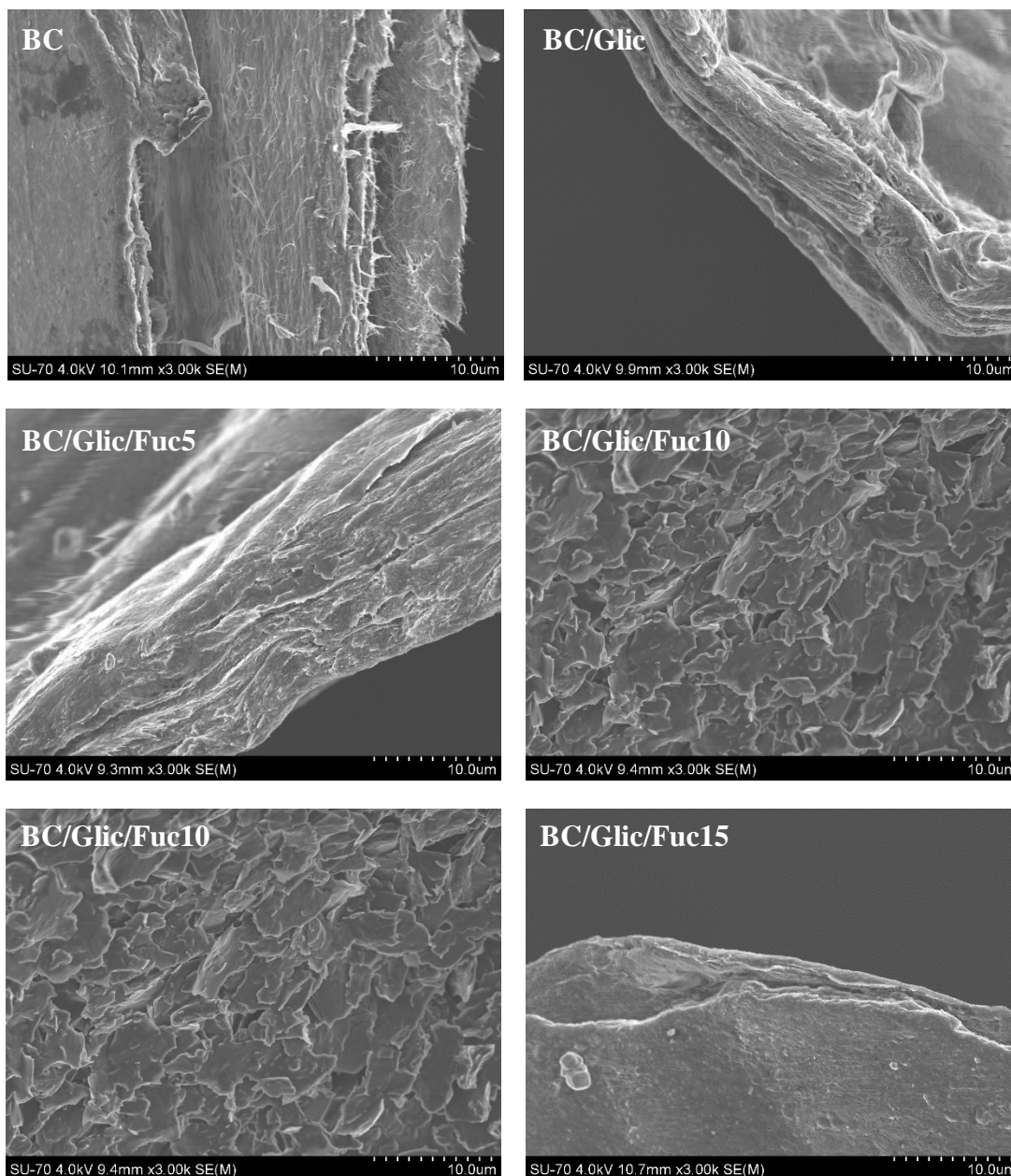


Figura 20: Micrografias de SEM da secção transversal (zona de quebra) das membranas de BC, BC/Glic e BC/Glic/Fuc.

A adição de fucoídano às membranas origina uma rede tridimensional mais compacta, com um menor número de espaços vazios, como se pode observar na Figura 19 e na Figura 20. Este polissacarídeo sulfatado preenche os espaços intersticiais da membrana, como se pode constatar pelas imagens das secções transversais das membranas BC/Glic/Fuc, que se encontram altamente preenchidas, formando uma rede mais densa e diminuindo o tamanho dos poros. Este comportamento é semelhante às observações de Lin *et al.* (56), em membranas de BC/quitosano, na qual se verificou um aumento da densidade da estrutura tridimensional da BC com a adição de quitosano, e ao reportado nos trabalhos de Cai *et al.* (107,108), no desenvolvimento de compósitos

de BC/PEG e BC/Colagénio, que revelou mais uma vez a formação de uma rede mais coesa e com um menor número de espaços vazios por penetração destes polímeros na matriz da BC.

4.3.4. Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) é um método de análise térmica que permite acompanhar mudanças na massa de um material em função do aumento da temperatura, a uma velocidade constante (109). Esta técnica é especialmente útil para a caracterização de materiais poliméricos (termoplásticos, compósitos, fibras e filmes), como é o caso das membranas produzidas neste trabalho.

Inicialmente analisou-se o extrato de fucoidano para determinar a sua estabilidade térmica e perfil de degradação. A Figura 21 apresenta as curvas de TGA e dTGA de fucoidano obtido a partir da alga pré-tratada (Fuc_PT), por extração com microondas, onde podemos distinguir três fases de degradação bem definidas. A primeira fase ocorre entre os 30-110°C em que se verifica perda de massa por desidratação da amostra, como observado por Rodriguez-Jasso *et al.* (72) e Anastasakis *et al.* (110) para amostras de *F. vesiculosus*, sem pré-tratamento. A cerca de 180°C ocorre a pirólise da amostra de fucoidano, com um pico a cerca de 236°C, terminando perto dos 692°C. A terceira etapa de degradação inicia-se perto dos 730°C e manteve-se até à temperatura final da análise, 800°C, estando associada normalmente à pirólise do esqueleto residual de carbono do polissacarídeo. A massa remanescente (cerca de 29% da massa original de fucoidano) corresponde ao conteúdo de cinza da amostra, sendo provavelmente constituída por sulfatos, fosfatos e carbonatos, minerais normalmente encontrados em extratos de polissacarídeos marinhos, como é o caso do fucoidano (110).

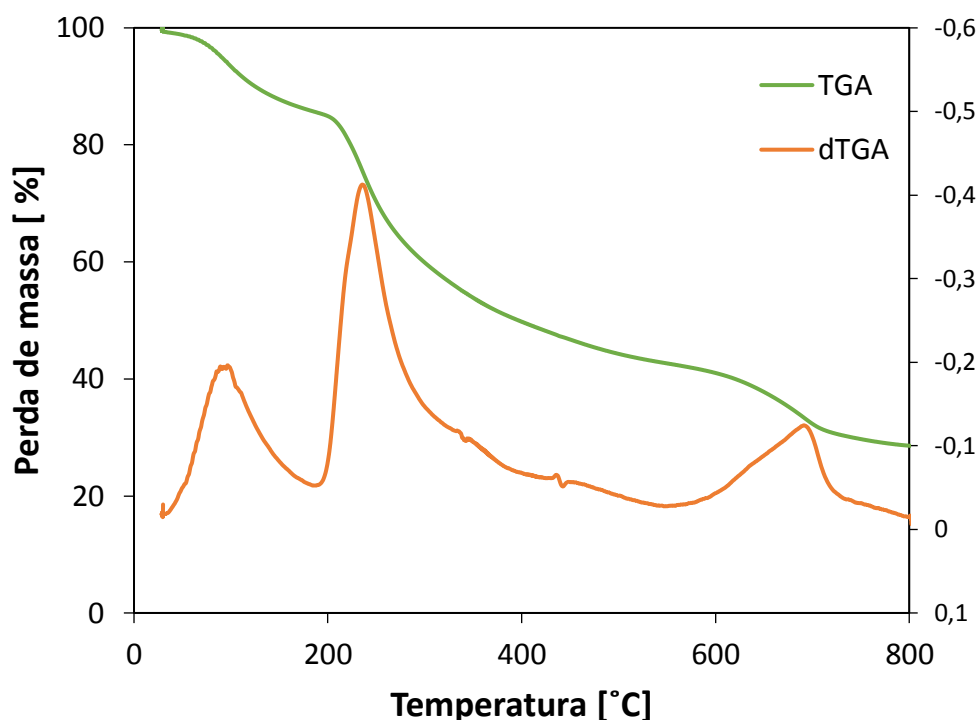


Figura 21: Curvas de TGA e dTGA de fucoidano extraído a partir de *Fucus vesiculosus* pré-tratada com clorofórmio e metanol (Fuc_PT) no intervalo 20-800°C.

A Figura 22 e a Figura 23 apresentam, respetivamente, as curvas de TGA e dTGA das membranas preparadas neste trabalho, BC, BC/Glic e BC/Glic/Fuc. Ambas os gráficos incluem as curvas de TGA e dTGA do fucoidano utilizado, Fuc_PT, para auxiliar a comparação com as membranas estudadas.

A membrana de BC pura (BC) apresenta um perfil de degradação com um único passo, iniciando-se a cerca de 280°C e com uma temperatura máxima de degradação a 345°C, semelhante ao reportado por Tomé *et al.* (52) para membranas de BC pura (366°C), embora não se tenha, no nosso caso, observado uma perda significativa de água na membrana estudada, à temperatura de 100°C (52,111), e que está obviamente relacionado com a eficiência da secagem. A membrana de BC com glicerol (BC/Glic) segue um padrão de degradação em dois passos, um inicial a cerca de 230°C que corresponde à volatilização do glicerol (112) e outro a 345°C associado com a degradação da BC, sendo que inicialmente ocorre também uma pequena perda de massa devido à desidratação da amostra.

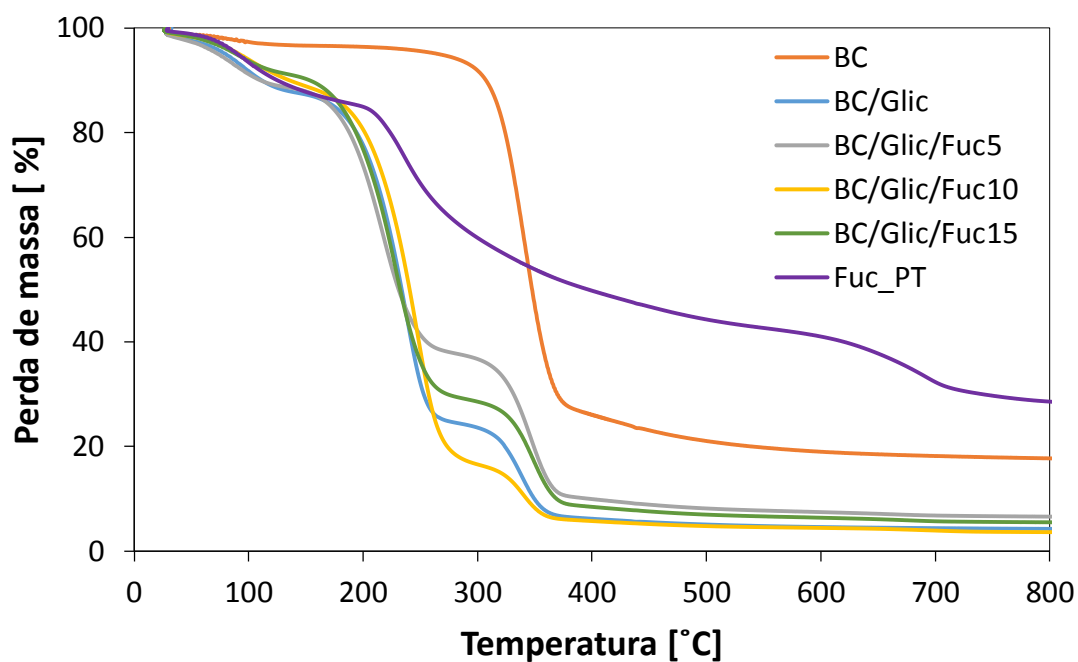


Figura 22: Curvas de perda de massa, em percentagem, das membranas de BC, BC/Glic e BC/Glic/Fuc e do fucoidano no intervalo 20-800°C.

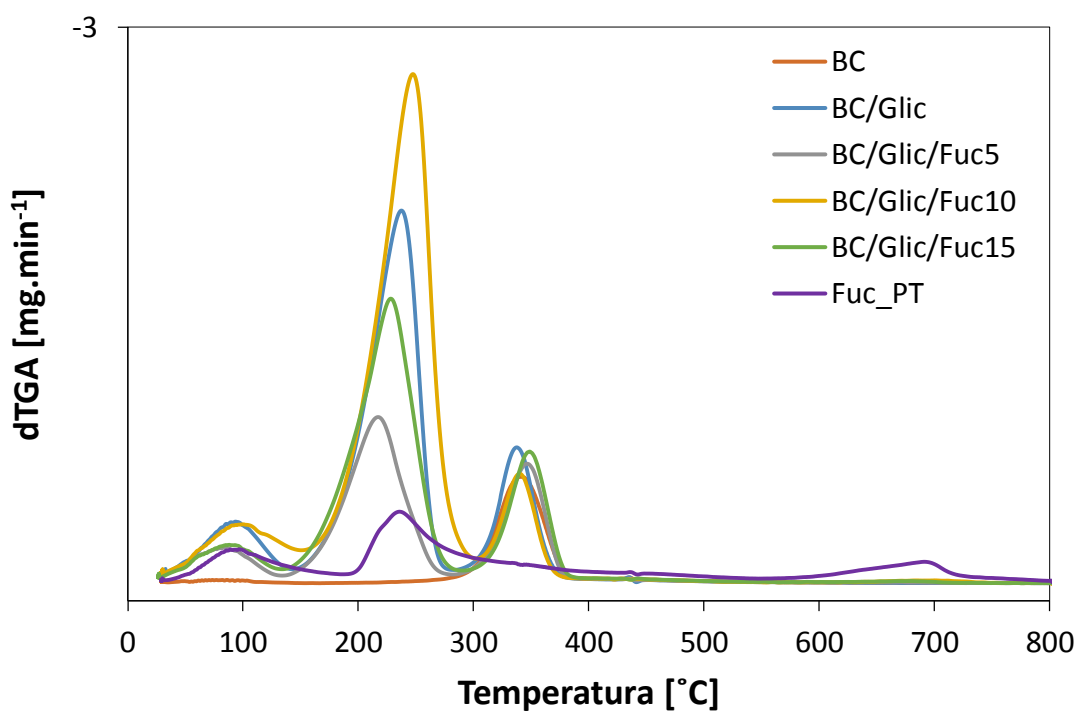


Figura 23: Curvas das derivadas das perdas de massa, das membranas de BC, BC/Glic e BC/Glic/Fuc e do fucoidano, no intervalo 20-800°C.

A introdução de fucoidano nas membranas de BC (amostras BC/Glic/Fuc) revela um perfil de degradação semelhante ao da BC/Glic, com a desidratação da amostra (30-110°C), volatilização do glicerol, utilizado como plastificante nas membranas, e

degradação simultânea do fucoidano (170-270°C) e degradação da BC (315-370°C). Verificou-se também que estas amostras foram praticamente totalmente degradadas até aos 800°C (resíduo com cerca de 7% da massa inicial da amostra).

Como referido anteriormente, os perfis de degradação térmica das membranas BC/Glic/Fuc são muito semelhantes entre si e semelhantes ao perfil de degradação da membrana BC/Glic. Uma vez que a quantidade de glicerol adicionado às membranas foi muito elevada, para garantir a maleabilidade das membranas, o glicerol desempenha um papel fundamental na estabilidade das membranas, determinando o seu perfil característico, comprovado pela elevada perda de massa observada neste passo. Isto explica ainda a diminuição observada no valor do resíduo final das membranas compósitas, já que o glicerol adicionado tinha uma pureza elevada (99,5%) e, por conseguinte, foi degradado totalmente deixando apenas alguns resíduos correspondentes a impurezas de BC e fucoidano.

Atendendo à aplicação que é sugerida para estas membranas como curativos na regeneração de pele, o perfil de degradação térmica das membranas BC/Glic/Fuc não se mostra problemático uma vez que estes materiais utilizados na área da medicina normalmente são esterilizados a temperaturas relativamente baixas (cerca de 150°C) às quais não se espera que haja degradação da amostra, para além da evaporação da água à temperatura de 100°C (113).

4.3.5. Ensaio mecânicos

O comportamento mecânico é crucial para o desempenho de um biomaterial, especialmente quando este é utilizado como implante ou dispositivo biomédico (114). As propriedades mecânicas de um biomaterial são, quase sempre, caracterizadas por tensões e deformações no material que advêm de cargas e deslocamentos neles aplicados. Assim, realizando ensaios de tração, em que o material é submetido a uma força que o distende até à rutura, podemos obter uma curva de tensão-deformação com a qual é possível analisar o comportamento do material ao longo do ensaio e obter valores de parâmetros como o módulo de Young, a resistência à tração e a percentagem de elongação do material até à sua rutura, entre outros (114). Após a análise das membranas BC, BC/Glic e BC/Glic/Fuc foram recolhidos os resultados obtidos no ensaio de tração e elaborados os respetivos gráficos, representados nas Figura 24 a Figura 26, e resumidos os valores médios dos referidos parâmetros, com os respetivos desvios padrão, na Tabela 3.

Tabela 3: Propriedades mecânicas (módulo de Young, resistência à tração e alongação até à quebra) das membranas BC, BC/Glic e BC/Glic/Fuc.

	Módulo de Young [MPa]	Resistência à tração [MPa]	Elongação até rutura [%]
BC	7902,77 ± 1637,91	146,62 ± 48,64	2,52 ± 0,95
BC/Glic	287,69 ± 116,59	33,54 ± 6,47	23,98 ± 1,71
BC/Glic/Fuc5	255,42 ± 21,71	38,09 ± 3,86	23,18 ± 1,00
BC/Glic/Fuc10	174,10 ± 28,64	24,55 ± 4,93	35,94 ± 4,10
BC/Glic/Fuc15	232,27 ± 43,56	30,79 ± 6,51	31,14 ± 2,28

No que diz respeito ao módulo de Young, também designado por módulo de elasticidade ou módulo de tensão, a membrana de BC apresenta um valor de cerca de 7903 MPa. Este valor é superior ao reportado por Lin *et al.* (56) para membranas de BC de *Acetobacter xylinum* (34 MPa) mas consideravelmente inferior ao reportado para membranas produzidas por *G. sacchari* (cerca de 19132 MPa) em estudos de Almeida *et al.* (47) e Silva *et al.* (99).

O valor do módulo de Young diminui para cerca de 288 MPa aquando a introdução de glicerol nas membranas, que corresponde a uma redução de cerca de 96%, quando comparado com o valor da membrana BC. Esta diminuição é semelhante à descrita por Silva *et al.* (99) para membranas de BC nas quais também foi incorporado 5% de glicerol, embora ambas sejam, como esperado, mais elevadas do que a reportada por Almeida *et al.* (47), utilizando concentrações de apenas 1% de glicerol, o que comprova que um aumento da concentração deste agente plastificante na membrana de BC provoca a diminuição do seu módulo de Young, tornando-as mais maleáveis.

As membranas que possuem fucoidano em diferentes concentrações (BC/Glic/Fuc) possuem também módulo de Young mais baixo que a BC inalterada, mas semelhante à membrana de BC/Glic, o que indica que o valor de módulo de Young está a ser influenciado, sobretudo, pela introdução de glicerol nas membranas. Contudo, estes valores são ainda mais elevados que os reportados para compósitos de BC/quitosano 0,6% (132 MPa) (56), de BC/alginato 1% (3,80 MPa) e de BC/PEG 1% (105 MPa), respetivamente, e semelhantes aos encontrados para compósitos de BC/colagénio (275 MPa), compósitos referidos como tendo aplicação a nível biomédico, nomeadamente em processos regenerativos (63,107,108).

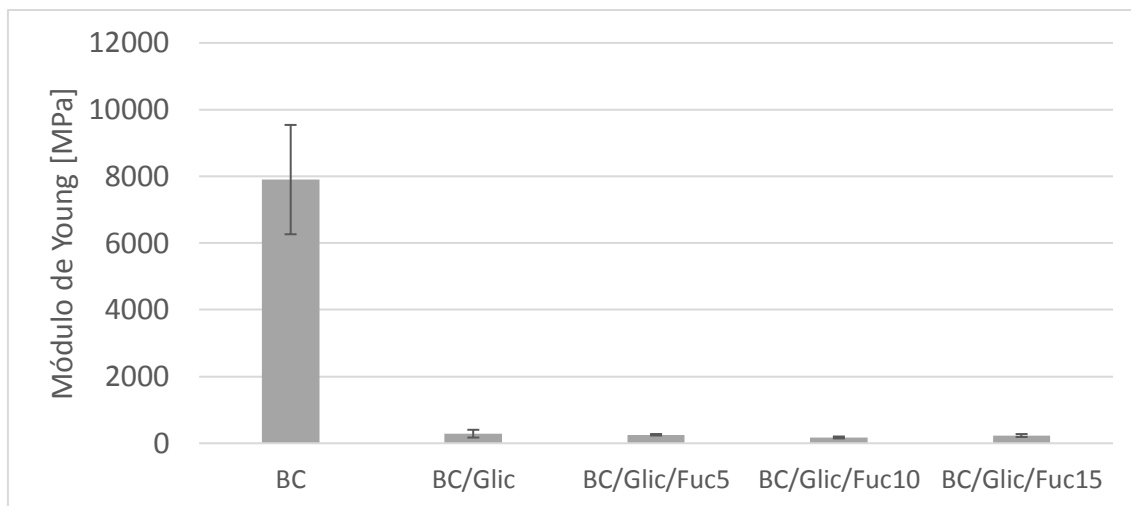


Figura 24: Gráfico do módulo de Young (MPa) calculado para cada membrana (BC, BC/Glic e BC/Glic/Fuc) a partir dos valores médios para cada espécime utilizado nos ensaios de tração.

A resistência à tração é a capacidade que o material tem de resistir à sua elongação, e corresponde à força de tensão no momento em que se dá a rutura do espécime, expressa normalmente em MPa (115). O valor médio de resistência à tração obtido para a membrana de BC pura foi de cerca de 147 MPa, inferior ao valor de resistência à tração obtido para membranas produzidas por *G. sacchari* (272 MPa) (47,99). Contudo, o valor obtido de resistência à tração da membrana de BC foi superior ao encontrado para membranas produzidas por outras bactérias do mesmo género, nomeadamente de *Gluconacetobacter xylinum*, como verificado nos trabalhos de Lin *et al.* (56) (cerca de 15 MPa) e Cai *et al.* (108) (96 MPa).

O valor de resistência à tração da membrana BC/Glic, com 5% de glicerol, é mais baixo (cerca de 34 MPa) que o obtido para a BC inalterada. Este resultado mostra-se concordante com a literatura consultada, por comparação com o artigo de Silva *et al.* (99), embora seja inferior ao reportado por este autor para membranas com a mesma concentração deste aditivo (90 MPa). Adicionalmente, confrontando estudos de Almeida *et al.* (47) e de Silva *et al.* (99), observam-se valores mais elevados de resistência à tração para membranas que contêm 1% de glicerol (360 MPa) comparativamente a membranas com 5% de glicerol (90 MPa), o que indica que a concentração de plastificante na membrana influencia a sua resistência à tração.

Aquando a adição de fucoidano obtiveram-se valores de resistência à tração para as membranas BC/Glic/Fuc semelhantes ao registado para a membrana BC/Glic o que indica, mais uma vez, que o glicerol é o principal responsável pela diminuição dos parâmetros mecânicos destas membranas, neste caso concretamente, na diminuição do

valor de resistência à tração. A membrana BC/Glic/Fuc10, com 10% de fucoidano, apresenta o valor mais baixo de resistência à tração, cerca de 25 MPa, seguida da membrana com 15% (31 MPa) e, finalmente, da membrana com 15% destes polissacarídeos sulfatados (38 MPa). Estes valores são mais elevados que a resistência à tração reportada para compósitos de BC/quitosano 0,6% (10 MPa), BC/PEG 1% (96 MPa) e BC/alginato 1% (3,8 MPa), o que indica que a adição de fucoidano na membrana resulta em membranas compósitas mais resistentes a forças de tensão (55,62,104).

No entanto as membranas com fucoidano apresentam valores de resistência à tração inferiores ao valor registado para membranas compósitas de BC/colagénio (275 MPa), o que poderá ser explicado pela elevada resistência à tração do colagénio devido à sua estrutura em tripla hélice (105).

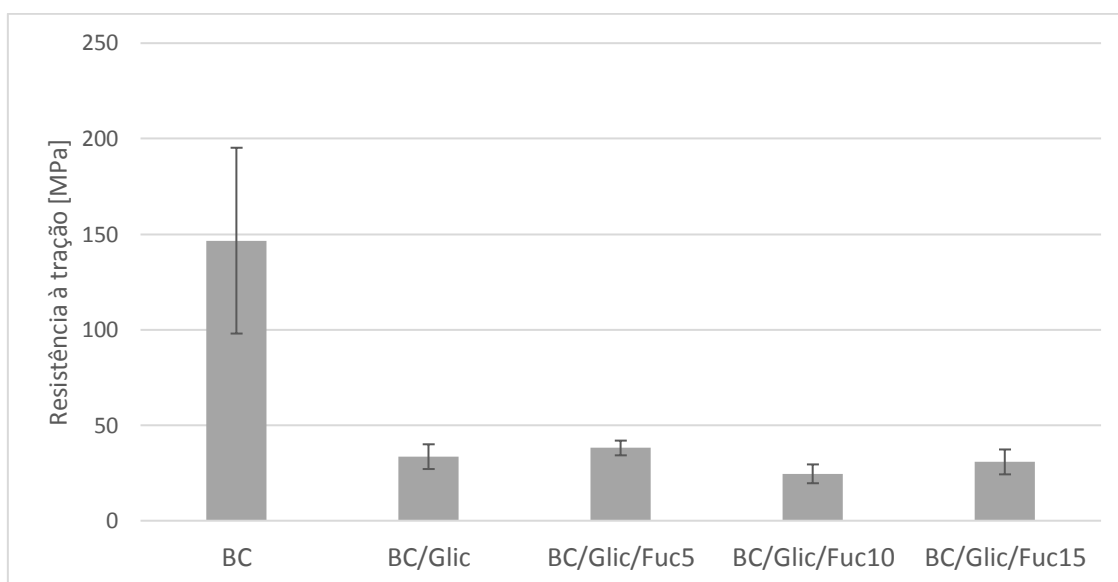


Figura 25: Resistência à tração (MPa) de cada membrana, calculada a partir do valor médio para cada espécime.

A elongação até à rutura é dada como a razão, expressa normalmente em percentagem, entre o comprimento alterado e o comprimento inicial do espécime testado e indica a deformação permanente relativamente ao ponto de quebra do material (115). O valor de elongação obtido para a BC pura foi de 2,52%, semelhante ao encontrado em literatura para membranas de BC provenientes de *G. sacchari* cultivadas estaticamente em meio HS, como é o caso de trabalhos de Almeida *et al.* (47) e de Silva *et al.* (99), que referem percentagens de elongação por volta dos 2,26%.

A membrana com glicerol, BC/Glic, apresenta um valor de alongação de cerca de 24%, bastante superior quando comparado à membrana de BC pura. Valores de cerca de 6,17% e 20,59% foram reportados na literatura para membranas de BC com glicerol a 1 e 5%, respetivamente (47,99,108,116). O valor obtido para a membrana BC/Glic é, então, semelhante à alongação obtida para membranas com a mesma quantidade de plastificante.

As membranas com fucoídano, BC/Glic/Fuc, apresentam percentagens de alongação ligeiramente mais elevadas que a membrana que contém apenas glicerol (36% para a BC/Glic/Fuc10 e 31% para a BC/Glic/Fuc15), com exceção da BC/Glic/Fuc5 que apresenta um valor similar à BC/Glic (cerca de 23%). Quando comparadas a outros compósitos de BC verifica-se também que a adição de polissacarídeos sulfatados na matriz origina membranas com percentagens de alongação até à rutura mais elevadas, em média, que outros compósitos estudados, como é o caso de BC/quitosano 0,6% (28,54%), BC/alginato 1% (2,61%), BC/colagénio (3,75%), BC/quitosano/alginato (2:1:1) (24,62%) e BC/PEG 1% (6,5%), o que demonstra que a adição de fucoídano nas membranas aparenta aumentar a sua resistência a deformações até ao ponto de quebra da membrana embora este efeito se deva, maioritariamente, à presença de glicerol, como pode ser observado na comparação dos valores de alongação entre as membranas de BC e BC/Glic (56,58,63,107,108).

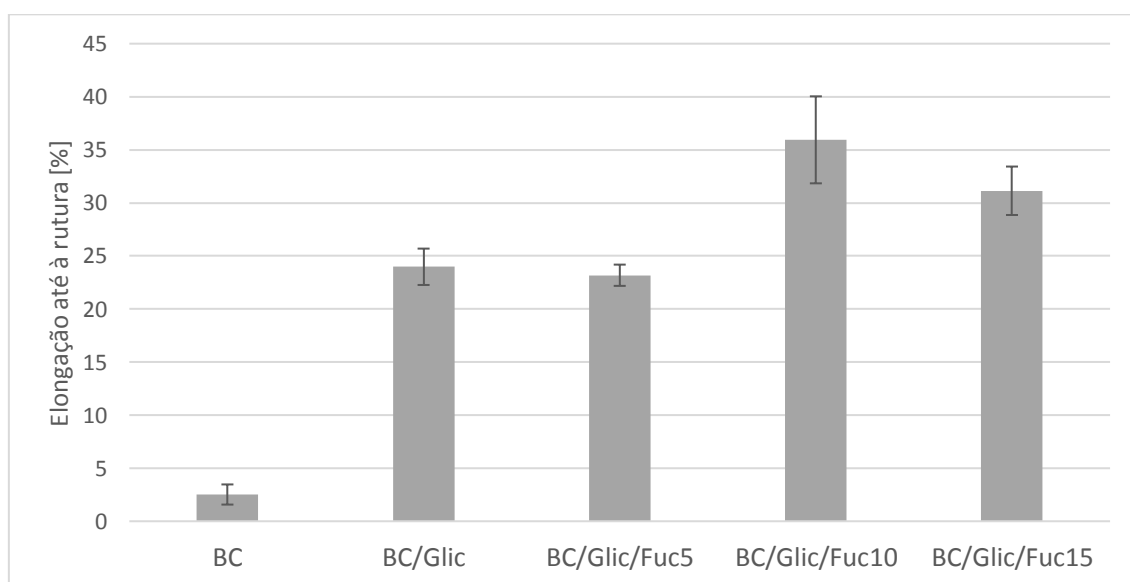


Figura 26: Percentagem de alongação da membrana até à sua rutura, calculada a partir dos valores médios de cada espécime.

Assim, de forma geral, podemos concluir que a introdução de fucoidano, em diferentes concentrações, nas membranas de BC resulta em compósitos com boas propriedades mecânicas, com valores mais elevados que os registados na maioria dos trabalhos acima citados, em que a BC é usada como reforço para outros polissacarídeos e proteínas. Estas são, no entanto, mais baixas quando comparadas com a BC pura já que a adição de glicerol, utilizado como plastificante, resulta numa diminuição dos parâmetros avaliados nos ensaios mecânicos efetuados. No entanto, a utilização de glicerol é necessária para garantir a maleabilidade e flexibilidade das membranas desenvolvidas, comprovada pelos elevados valores de elongação até à rutura das membranas que possuem este composto. De facto, atendendo a estas características, as membranas de BC/Glic/Fuc mostram-se boas candidatas ao uso como curativos na regeneração de pele.

As diferenças encontradas para os valores de resistência à tração de membranas com 5, 10 e 15% não aparentam ser estatisticamente significativas ($p > 0,05$), pelo que se pode pressupor que diferenças na concentração de fucoidano não influenciam significativamente as propriedades mecânicas destes compósitos.

4.3.6. Absorção de água

Uma das mais importantes características que um biomaterial pode possuir é a capacidade de absorver água ao longo do tempo, influenciando parâmetros como a sua degradação, propriedades mecânicas e adesivas, podendo ainda determinar perfis de libertação de fármacos e a resposta biológica ao material (114,117,118). Esta característica pode influenciar as propriedades mecânicas e futura aplicação do biomaterial produzido sendo, portanto, um parâmetro a ter em consideração na caracterização de biomateriais, como é o caso das membranas compósitas produzidas neste trabalho. Assim, a capacidade de absorção de água das membranas foi avaliada para 0,5, 8 e 24h após a imersão dos espécimes em água, e calculada a percentagem de absorção de água (W) através da variação do peso. Os resultados obtidos encontram-se representados no gráfico da Figura 27.

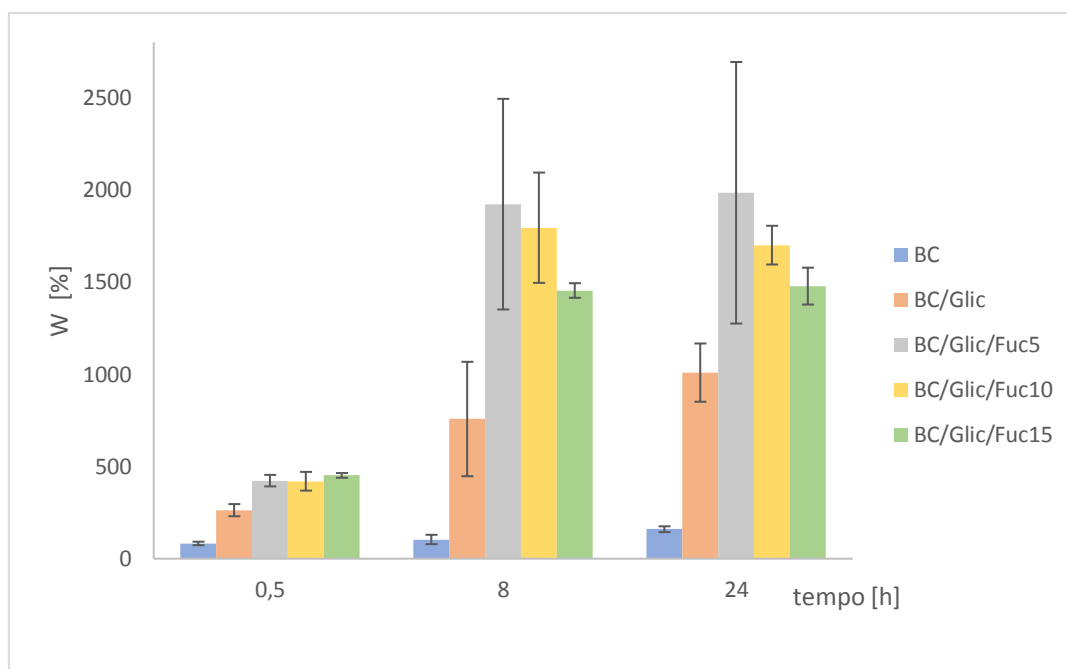


Figura 27: Percentagem de água absorvida (W) pelas membranas após 0,5, 8 e 24h de imersão em água destilada, à temperatura ambiente.

Através do gráfico acima apresentado podemos verificar diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre a medição inicial e a medição a 8h, sendo que na medição às 24h se observam valores de W semelhantes aos da medição anterior ($p > 0,05$). Verifica-se ainda, ao tempo 0,5 h, que a membrana BC/Glic apresenta um valor de W três vezes superior ao da membrana BC. Nas medições a 8 e 24h também se observam diferenças consideráveis (7x e 6x, respetivamente) entre o valor de W das membranas BC e BC/Glic, sendo esta variação explicada pela incorporação de glicerol, que influencia a capacidade de absorção de água das membranas de BC devido às suas propriedades hidrofílicas e humectantes (47,99). Adicionalmente, a presença de moléculas de glicerol na matriz limita o colapso da sua estrutura tridimensional durante a secagem das membranas, permitindo que se forme um maior número de poros na matriz, como observado nas micrografias de SEM anteriormente apresentadas, facilitando também a sua reidratação.

Quanto às membranas BC/Glic/Fuc verificam-se valores de W superiores às membranas controlo de BC e BC/Glic, sendo as percentagens máximas obtidas ao tempo 8h, 18,5x, 17x e 14x superiores, respetivamente, para as membranas com 5%, 10% e 15% de fucoidano, quando comparadas com a BC. Aos tempos 8h e 24h observa-se ainda que a membrana com menor concentração de fucoidano possui uma percentagem de W mais elevada que as membranas com 10 e 15%. Este comportamento

é semelhante ao verificado por Pavaloiu *et al.* (119) , em compósitos de BC e gelatina (1, 5 e 10%), observando-se valores superiores de W para a membrana com 1% de gelatina, sugerindo que o valor de W depende da concentração do aditivo incorporado, uma vez que uma maior concentração do mesmo permite uma maior densidade de ligações cruzadas e diminui os espaços vazios na matriz, levando a uma diminuição da absorção de água.

Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram observadas entre membranas com diferentes concentrações de fucoidano (BC/Glic/Fuc com 5, 10 e 15% de fucoidano), o que indica que a concentração destes polissacarídeos sulfatados influencia a capacidade de absorção de água das membranas, como seria de esperar pela observação das micrografias de SEM. As membranas compósitas de BC/Glic/Fuc possuem elevada capacidade de absorção de água, sendo este comportamento essencial para permitir a absorção de exsudado dos ferimentos e manutenção da humidade local, para além de ser uma característica importante para a atuação do fucoidano incorporado no local lesado.

4.4. Avaliação da atividade biológica

Uma vez avaliadas as propriedades mecânicas das membranas desenvolvidas neste trabalho, e atendendo à sua finalidade como potencial curativo para regeneração da pele, foram efetuados alguns ensaios preliminares de atividade biológica, tendo-se escolhido analisar, primeiramente, o fucoidano extraído de *F. vesiculosus*, avaliando parâmetros como a atividade antioxidante, viabilidade celular e atividade anti-inflamatória.

4.4.1. Determinação da atividade antioxidante do fucoidano extraído

A atividade antioxidante do fucoidano extraído de *F. vesiculosus*, calculada como a percentagem de inibição do radical DPPH de amostras com concentrações variáveis de fucoidano, encontra-se representada na Figura 28. Pode-se observar um aumento da capacidade inibitória do radical DPPH, traduzida em percentagem, com o aumento da concentração de fucoidano da amostra, sendo que a amostra menos concentrada ($0,17 \text{ mg.mL}^{-1}$) apresenta uma inibição do radical DPPH de 2,57% e a mais concentrada ($1,17 \text{ mg.mL}^{-1}$) de 62,4%. Estes valores são superiores aos reportados por Rodriguez-Jasso *et al.* (91) para avaliação da atividade antioxidante de fucoidano extraído de *F.*

vesiculosus, recorrendo ao método de neutralização do radical DPPH, já que o valor mais elevado de atividade antioxidante indicado nesse estudo foi cerca de 23%, para uma amostra com 1 mg.mL^{-1} de fucoidano e, para a mesma concentração, o valor de atividade antioxidante obtido nesta dissertação foi cerca de duas vezes superior (48%). Esta diferença nos valores de atividade antioxidante pode dever-se à utilização de um passo de pré-tratamento da alga utilizada neste trabalho, à composição da mesma, que varia consoante o local e a época de recolha, como mencionado anteriormente, mas também à presença de algumas impurezas no fucoidano extraído, nomeadamente a fucoxantina, que apresenta atividade antioxidante, provocando um aumento da percentagem de inibição do radical DPPH (65,120).

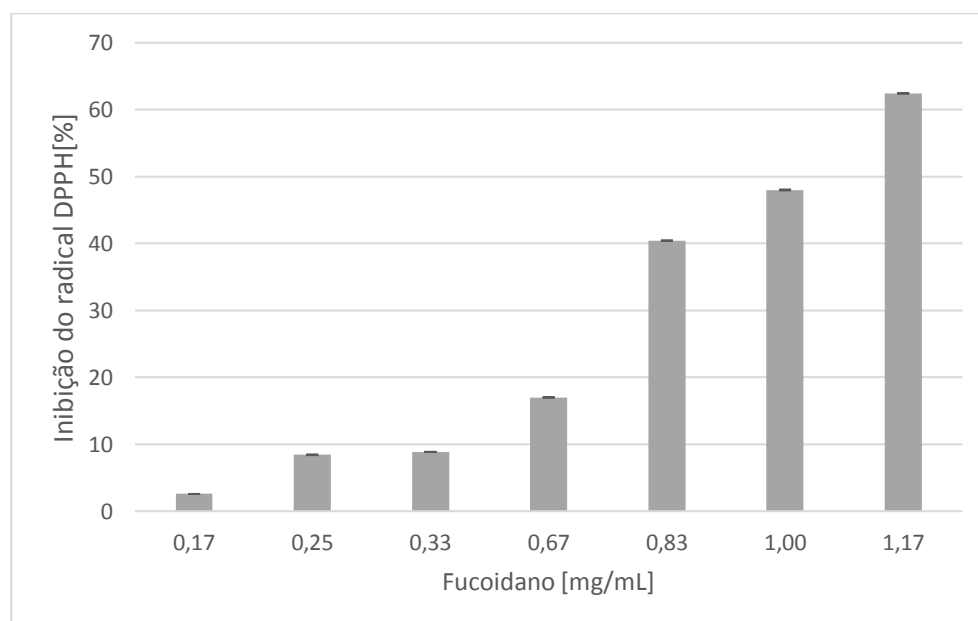


Figura 28: Inibição do radical DPPH (%) após adição do fucoidano, utilizando amostras com concentrações variáveis deste composto.

Uma vez que toda a solução de fucoidano foi absorvida pelas membranas de BC podemos tentar extrapolar as suas atividades antioxidantes, a partir da concentração de fucoidano presente em cada uma delas. Admitindo que é utilizado como penso uma membrana com 4 cm^2 de área, temos concentrações de fucoidano de cerca de 0,46, 0,92 e $1,59 \text{ mg.mL}^{-1}$ (admitindo um volume final de 3 mL, como utilizado para a determinação da atividade antioxidante do fucoidano) para as membranas BC/Glic/Fuc5, BC/Glic/Fuc10 e BC/Glic/Fuc15, respetivamente. Assim, atendendo ao gráfico anteriormente apresentado espera-se que a atividade antioxidante nestes pensos seja de cerca de 10-20% para a membrana de BC/Glic/Fuc5, entre 40 e 50% para a

membrana com 10% de fucoidano e que aumente para um valor superior a 60% para a membrana com maior quantidade de fucoidano, BC/Glic/Fuc15, o que indica que esta última poderá apresentar uma maior atividade antioxidante, que é um parâmetro fundamental para o processo de regeneração tecidual. Contudo, testes de atividade antioxidante das membranas terão que ser conduzidos futuramente para verificar a veracidade destes valores.

4.4.2. Avaliação da viabilidade celular de RAW 264.7 na presença de fucoidano

Os ensaios de viabilidade celular são frequentemente utilizados para determinar se alguns compostos, como é o caso de polissacarídeos e outras macromoléculas extraídas de algas, possuem efeitos na proliferação celular ou mostram efeitos citotóxicos que eventualmente poderão levar à morte celular (121). Uma vez que foi reportado que o fucoidano extraído de algas *F. vesiculosus* induz a apoptose de linhas celulares de cancro humano foi necessário avaliar a citotoxicidade do fucoidano obtido neste trabalho em células de macrófagos de ratinhos leucêmicos, RAW 264.7, sendo a percentagem de viabilidade apresentada na Figura 29 (122). Podemos observar que mesmo utilizando a concentração mais elevada de fucoidano, 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, obteve-se elevada percentagem de viabilidade celular ($97,7 \pm 1,12\%$), o que indica que até à concentração indicada o fucoidano extraído de *F. vesiculosus* sujeita a pré-tratamento não apresenta efeitos citotóxicos notórios para a linha celular utilizada.

No âmbito deste trabalho não foi possível avaliar a citotoxicidade das membranas BC/Glic/Fuc produzidas, reservando-se esta avaliação para trabalho futuro. Atendendo que num penso 2 por 2 cm^2 , a concentração mínima de fucoidano (membrana BC/Glic/Fuc5) presente é de cerca de 460 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, bastante acima do limite testado, não podemos inferir acerca do seu efeito na viabilidade celular da linha RAW 264.7 utilizada embora, atendendo aos elevados valores de viabilidade celular à concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de fucoidano ($97,7 \pm 1,12\%$), espera-se que a análise destas membranas revele também baixos efeitos citotóxicos nesta linha celular.

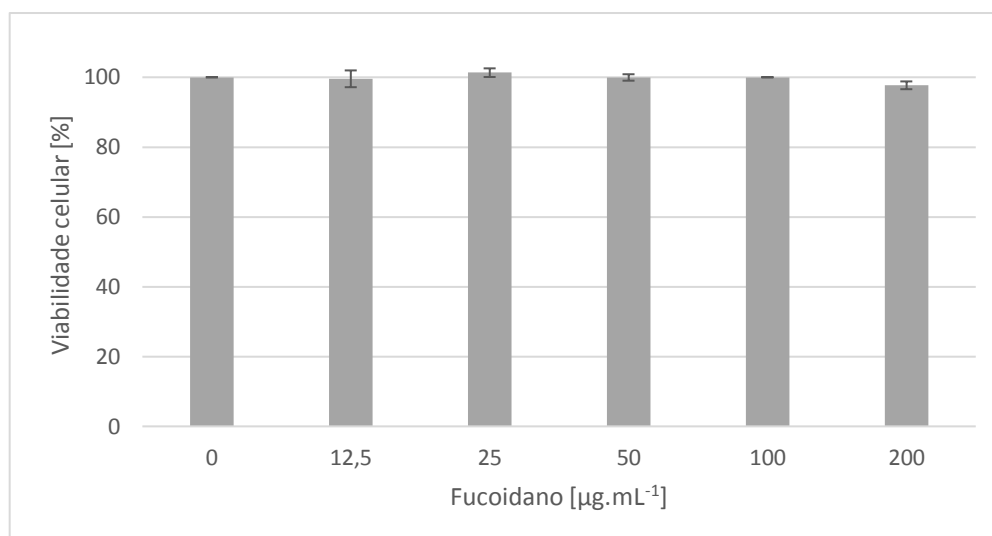


Figura 29: Viabilidade celular (%) de amostras com diferentes concentrações de fucoidano extraído de *F. vesiculosus*.

4.4.3. Determinação da atividade anti-inflamatória do fucoidano

Uma vez garantida a viabilidade celular para as concentrações de fucoidano anteriormente descritas procedeu-se ao estudo da atividade anti-inflamatória deste composto, utilizando como modelo inflamatório a linha celular de macrófagos de murganho leucémico, RAW 264.7, determinando as respetivas concentrações de óxido nítrico (NO) produzido pelas amostras com e sem adição de LPS (Figura 30).

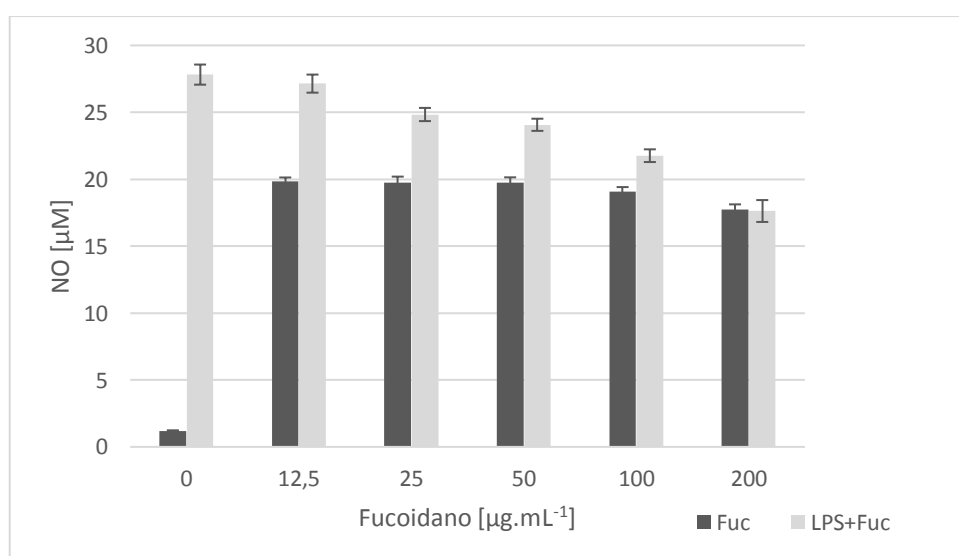


Figura 30: Estudo da atividade anti-inflamatória do fucoidano extraído de *F. vesiculosus*, através da libertação de óxido nítrico (NO).

Ao contrário do que era expectável, uma vez que a literatura descreve o fucoidano como um composto com atividade anti-inflamatória, a adição deste polissacarídeo sulfatado promoveu a libertação de óxido nítrico, mesmo em células que não foram estimuladas com LPS (cerca de $19,2 \pm 0,9 \mu\text{M}$) (83). Nas culturas celulares estimuladas com LPS verificou-se uma produção de cerca de $27,8 \mu\text{M}$ de NO, tendo este valor diminuído gradualmente com o aumento da concentração de fucoidano adicionado ($17,6 \mu\text{M}$, para $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Assim, verificou-se que o fucoidano provoca a libertação de NO em células não estimuladas com LPS, até $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, mas a presença do lipopolissacarídeo na cultura celular desencadeia alguma atividade anti-inflamatória característica destes polissacarídeos sulfatados, embora ainda haja produção de NO por parte destas células, quando comparadas com o controlo ($0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de fucoidano, sem LPS).

Esta ação dupla do fucoidano foi reportada por Yang *et al.* (123) mostrando que concentrações baixas deste composto ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) aumentaram a expressão de iNOS em células RAW 264.7 não estimuladas, mas, aquando a adição de LPS, deu-se uma repressão da indução da iNOS, a concentrações superiores a $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Além disso, estudando a produção de NO em células estimuladas com LPS, foi verificado que o aumento da concentração de fucoidano promove a ação anti-inflamatória deste composto, diminuindo a quantidade de NO libertada, até valores próximos do controlo. Esta inibição da expressão da iNOS em macrófagos ativados com LPS dá-se, provavelmente, pelo bloqueio seletivo da proteína ativadora 1 (AP-1), um fator de transcrição que regula a expressão de vários genes envolvidos na diferenciação celular e apoptose, como é o caso do NF- κ B (123). Uma vez que a ativação destes fatores de transcrição é controlada pela formação de ROS, e que a ativação da proteína AP-1 é dependente do estado de oxidação/redução da célula, o seu bloqueio seletivo por parte do fucoidano pode-se dever à atividade antioxidante deste composto.

Apesar de, mesmo à concentração máxima, os valores de NO produzido não se encontrarem próximos do controlo, o comportamento da amostra de fucoidano foi similar ao estudado por Yang *et al.* (123), assim como ao reportado por um estudo de Lee *et al.* (124), o que indica a possibilidade de ação anti-inflamatória do fucoidano extraído, a concentrações elevadas. No entanto, sem o estudo da produção de NO a concentrações superiores a $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em células com e sem estimulação com LPS, bem como a avaliação da expressão de moléculas envolvidas no processo inflamatório,

não podemos retirar conclusões definitivas acerca da atividade do fucoidano extraído neste trabalho, no modelo inflamatório utilizado.

5. Conclusões

Com este trabalho foi possível proceder à extração de fucoidano a partir da alga *Fucus vesiculosus*, proveniente da costa portuguesa, recorrendo à metodologia de extração assistida por microondas (MAE), tendo-se obtido percentagens de recuperação deste polissacarídeo sulfatado de $14,8 \pm 1,0\%$, para os extratos de *Fucus vesiculosus* pré-tratada com clorofórmio e metanol.

Este composto foi incorporado em membranas de BC, em concentrações de 5, 10 e 15% (m/m), e utilizando glicerol, a 5%, como agente plastificante para permitir uma maior maleabilidade destes compósitos. Estes foram caracterizados por espectroscopia de UV-vis, FTIR-ATR, SEM, ensaios mecânicos, TGA e absorção de água, sendo então cumprido o objetivo principal do trabalho com o desenvolvimento e caracterização destes compósitos.

Com a espectroscopia de UV-vis foi verificada a translucidez das membranas na região do visível (400 a 750 nm) e a existência de uma banda a 260 nm, que demonstra a propriedade de proteção UV do fucoidano introduzido nestes compósitos. A incorporação de fucoidano nas membranas foi confirmada através da existência de picos característicos deste polissacarídeo sulfatado nos espectros de FTIR-ATR (1206 cm^{-1} , correspondente aos grupos S=O) e a análise das micrografias de SEM obtidas a 4 kV, onde se verifica a existência de uma matriz mais compacta e densa nas membranas BC/Glic/Fuc, quando comparadas com a membrana de BC puras. Na análise de TGA obtiveram-se os perfis de degradação térmica das membranas BC/Glic/Fuc, determinados sobretudo pela quantidade de glicerol utilizado, apresentando estabilidade a temperaturas normalmente utilizadas para a esterilização deste tipo de compósitos.

Através dos ensaios mecânicos foram avaliadas propriedades como o módulo de Young ($232,3 \pm 41,9\text{ MPa}$), a resistência à tração ($30,8 \pm 6,8\text{ MPa}$) e a percentagem de alongação até à rutura das membranas ($31,1 \pm 6,4\%$), demonstrando que os compósitos com fucoidano apresentam boas propriedades mecânicas, com valores mais elevados que muitos compósitos de BC utilizados na regeneração tecidual, reportados na literatura consultada. Estes apresentam ainda elevada flexibilidade e maleabilidade, comprovada pelo elevado valor de alongação, características essenciais para a sua possível aplicação como curativo. As membranas BC/Glic/Fuc revelaram ainda uma elevada capacidade de absorção de água ($W_{\text{máximo}}=18,5x$, relativamente a BC inalterada), uma característica também importante para sua aplicação como curativo.

Finalmente, foram ainda realizados alguns ensaios preliminares de avaliação biológica, como citotoxicidade e atividades antioxidante e anti-inflamatória, tendo-se iniciado este estudo com o fucoidano extraído. O fucoidano extraído de *F. vesiculosus* demonstrou elevada atividade antioxidante (62,4%, para a amostra com 1,17 mg.mL⁻¹ de fucoidano) e viabilidade celular até 200 µg.mL⁻¹. Contudo, não foi possível concluir acerca da atividade anti-inflamatória do fucoidano extraído neste trabalho uma vez que este demonstrou um efeito indutor da produção de NO em células RAW 264.7 não estimuladas, mas apresentou um efeito parcialmente inibidor em células estimuladas com LPS, com o aumento da concentração. No entanto, uma vez que o comportamento deste composto se altera com a concentração espera-se que, com a realização de novos testes utilizando concentrações superiores a 200 µg.mL⁻¹, se dê uma inibição completa da produção de NO.

Assim, podemos concluir que tendo em conta as suas boas propriedades óticas, mecânicas e a sua elevada capacidade de absorção de água as membranas compósitas de BC e fucoidano (BC/Glic/Fuc) mostram-se promissoras para a aplicação como curativo de feridas da pele.

Futuramente, será necessário completar este trabalho com o estudo da atividade biológica das membranas desenvolvidas, bem como a sua aplicação como curativo em modelos animais, como ratinhos, realizando estudos histológicos e de biocompatibilidade que ajudarão a confirmar esta possível aplicação. Espera-se que atendendo à sua possível atividade antioxidante e anti-inflamatória, a introdução de polissacarídeos sulfatados não seja apenas uma forma de melhorar as propriedades da BC, utilizada como matriz, mas também de acelerar a regeneração da pele no local lesado, diminuindo os efeitos inflamatórios sofridos no processo de cicatrização.

6. Bibliografia

1. Ather S, Hargding K. Wound management and dressings. In: *Advanced Textiles for wound care*. Oxford: Elsevier; 2009. p. 3–19.
2. Anderson K, Hamm RL. Factors that impair wound healing. *Journal of the American College of Clinical Wound Specialists*. 2012 Dec;4(4):84–91.
3. Williams PA, Phillips GO. Introduction to food hydrocolloids. In: *Handbook of Hydrocolloids*. 2nd ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2009. p. 1–22.
4. Esa F, Tasirin SM, Rahman NA. Overview of Bacterial Cellulose Production and Application. *Italian Oral Surgery*. 2014 Dec;2:113–9.
5. Chandika P, Ko SC, Jung WK. Marine-derived biological macromolecule-based biomaterials for wound healing and skin tissue regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015 Feb;77:24–35.
6. Jeon YJ, Wijesinghe WJ, Kim SK. Functional properties of brown algal sulfated polysaccharides, fucoidans. *Advances in Food and Nutrition Research*. 2011 Sep;64:163–78.
7. Stedman TL. *Stedman's Medical Dictionary for the Health Professions and Nursing*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008. 1813 p.
8. Childs DR, Murthy AS. Overview of Wound Healing and Management. *Surgical Clinics of North America*. 2017 Dec;97(1):189–207.
9. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins Basic Pathology*. 9th ed. Philadelphia: Elsevier Health Sciences; 2012. 29-74 p.
10. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *European Surgical Research*. 2012 Mar;49(1):35–43.
11. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*. 2004 Jan;9(1):283–9.
12. Wu Y, Tredget EE. Pathology of Tissue Regeneration Repair: Skin Regeneration. In: *Pathobiology of Human Disease*. Oxford: Elsevier; 2014. p. 558–66.
13. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, et al. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008 May;453(7193):314–21.
14. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology*. 2007 Feb;25(1):9–18.
15. Heng MCY. Wound healing in adult skin: Aiming for perfect regeneration. *International Journal of Dermatology*. 2011 Sep;50(9):1058–66.
16. Frykberg RG, Banks J. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Advances in Wound Care*. 2015 May;4(9):560–82.
17. Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research*. 2010 Oct;89(3):219–29.
18. Vowden K, Vowden P. Wound dressings: principles and practice. *Surgery*. 2014 Oct;32(9):462–7.

19. Davis J, McIister A. History and Evolution of Bandages , Dressings , and Plasters. In: Smart Bandage Technologies: Design and Application. London: Elsevier Inc.; 2016. p. 63–92.
20. Selig HF, Lumenta DB, Giretzlehner M, et al. The properties of an “ideal” burn wound dressing - What do we need in daily clinical practice? Results of a worldwide online survey among burn care specialists. *Burns*. 2012 Nov;38(7):960–6.
21. Watson NF, Hodgkin W. Wound dressings. *Surgery*. 2005 Feb;23(2):52–5.
22. Halstead FD, Rauf M, Bamford A, et al. Antimicrobial dressings: Comparison of the ability of a panel of dressings to prevent biofilm formation by key burn wound pathogens. *Burns*. 2015 Jun;41(8):1683–94.
23. Voncina B, Zemljič Fras L, Ristic T. Active Textile Dressings for Wound Healing. In: *Advances in Smart Medical Textiles: Treatments and Health Monitoring*. London: Elsevier; 2015. p. 73–92.
24. Aramwit P. Introduction to biomaterials for wound healing. In: *Wound Healing Biomaterials*. London: Elsevier; 2016. p. 3–38.
25. Mogoșanu GD, Grumezescu AM. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014 Dec;463(2):127–36.
26. Qin Y, Qin Y. Functional wound dressings. In: *Medical Textile Materials*. Cambridge: Elsevier; 2016. p. 89–107.
27. Schmitz M, Eberlein T, Andriessen A. Wound treatment costs comparing a bio-cellulose dressing with moist wound healing dressings and conventional dressings. *Wound Medicine*. 2014 Jul;6:11–4.
28. Jayakumar R, Prabakaran M, Sudheesh Kumar PT, et al. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances*. 2011 Jan;29(3):322–37.
29. Korrapati PS, Karthikeyan K, Satish A, et al. Recent advancements in nanotechnological strategies in selection, design and delivery of biomolecules for skin regeneration. *Materials Science and Engineering C*. 2016 May;67:747–65.
30. Rhett JM, Ghatnekar GS, Palatinus JA, et al. Novel therapies for scar reduction and regenerative healing of skin wounds. *Trends in Biotechnology*. 2008 Mar;26(4):173–80.
31. Dorai AA. Wound care with traditional, complementary and alternative medicine. *Indian Journal of Plastic Surgery: Official Publication of the Association of Plastic Surgeons of India*. 2012 Aug;45(2):418–24.
32. Saltmarche AE. Low level laser therapy for healing acute and chronic wounds - The extendicare experience. *International Wound Journal*. 2008 Jun;5(2):351–60.
33. Eskes AM, Ubbink DT, Lubbers MJ, et al. Hyperbaric Oxygen Therapy: Solution for Difficult to Heal Acute Wounds? Systematic Review. *World Journal of Surgery*. 2011 Mar;35(3):535–42.
34. Chawla PR, Bajaj IB, Survase S a., et al. Microbial cellulose: Fermentative production and applications (Review). *Food Technology and Biotechnology*. 2009 Dec;47(2):107–24.
35. Petersen N, Gatenholm P. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011 Jun;91(5):1277–86.
36. Czaja W, Krystynowicz A, Bielecki S, et al. Microbial cellulose - The natural power to heal wounds. *Biomaterials*. 2006 Feb;27(2):145–51.

37. Freitas F, Alves VD, Reis MA, et al. Microbial polysaccharide-based membranes: Current and future applications. *Journal of Applied Polymer Science*. 2014 Sep;131(6):1–11.
38. Torres FG, Commeaux S, Troncoso OP. Biocompatibility of bacterial cellulose based biomaterials. *Journal of Functional Biomaterials*. 2012 Dec;3(4):864–78.
39. Huang C, Yang X-Y, Xiong L, et al. Utilization of Corn cob Acid Hydrolysate for Bacterial Cellulose Production by *Gluconacetobacter xylinus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2015 Nov;175(3):1678–88.
40. Cacicedo ML, Castro MC, Servetas I, et al. Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications. *Bioresource Technology*. 2015 Feb;213:172–80.
41. Stumpf TR, Yang X, Zhang J, et al. In situ and ex situ modifications of bacterial cellulose for applications in tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*. 2016 Nov;
42. de Olyveira GM, Costa LMM, Riccardi C dos S, et al. Bacterial cellulose for advanced medical materials. In: *Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering*. London: Elsevier; 2016. p. 57–82.
43. Shah N, Ul-Islam M, Khattak WA, et al. Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material. *Carbohydrate Polymers*. 2013 Nov;98(2):1585–98.
44. Kalia S, Dufresne A, Cherian BM, et al. Cellulose-based bio- and nanocomposites: A review. *International Journal of Polymer Science*. 2011 Aug;2011:1–35.
45. Amnuaikit T, Chusuit T, Raknam P, et al. Effects of a cellulose mask synthesized by a bacterium on facial skin characteristics and user satisfaction. *Medical Devices: Evidence and Research*. 2011 Jun;4(1):77–81.
46. Hasan N, Biak DRA, Kamarudin S. Application of Bacterial Cellulose (BC) in Natural Facial Scrub. *International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology*. 2012 Jan;2(4):1–4.
47. Almeida IF, Pereira T, Silva NHCS, et al. Bacterial cellulose membranes as drug delivery systems: An in vivo skin compatibility study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2014 Aug;86(3):332–6.
48. de Oliveira Barud HG, da Silva RR, da Silva Barud H, et al. A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose. *Carbohydrate Polymers*. 2016 Jul;153:406–20.
49. Muangman P, Opananon S, Suwanchot S, et al. Efficiency of microbial cellulose dressing in partial-thickness burn wounds. *Journal of the American College of Certified Wound Specialists*. 2011 Apr;3(1):16–9.
50. Levinson DJ, King S. Microbial Cellulose Wound Dressing in the Treatment of Skin Tears in the Frail Elderly. *Wounds*. 2010 Jan;22(1):17–9.
51. Sulaeva I, Henniges U, Rosenau T, et al. Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications: A review. *Biotechnology Advances*. 2015 Jul;33(8):1547–71.
52. Tomé LC, Brandão L, Mendes AM, et al. Preparation and characterization of bacterial cellulose membranes with tailored surface and barrier properties. *Cellulose*. 2010 Sep;17(6):1203–11.
53. Wu J, Zheng Y, Yang Z, et al. Chemical modifications and characteristic changes in bacterial cellulose treated with different media. *Journal of Polymer Research*. 2012 Aug;19(9):9945.

54. Liu J, Willför S, Xu C. A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. 2015 Jan;5(1):31–61.
55. Ruocco N, Costantini S, Guariniello S, et al. Polysaccharides from the marine environment with pharmacological, cosmeceutical and nutraceutical potential. *Molecules*. 2016 May;21(5).
56. Lin WC, Lien CC, Yeh HJ, et al. Bacterial cellulose and bacterial cellulose-chitosan membranes for wound dressing applications. *Carbohydrate Polymers*. 2013 Jan;94(1):603–11.
57. Dragostin OM, Samal SK, Dash M, et al. New antimicrobial chitosan derivatives for wound dressing applications. *Carbohydrate Polymers*. 2016 May;141:28–40.
58. Chang W-S, Chen H-H. Physical properties of bacterial cellulose composites for wound dressings. *Food Hydrocolloids*. 2016 Dec;53:75–83.
59. Fu L, Zhang J, Yang G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. *Carbohydrate Polymers*. 2013 Oct;92(2):1432–42.
60. Lu Z, Gao J, He Q, et al. Enhanced antibacterial and wound healing activities of microporous chitosan-Ag/ZnO composite dressing. *Carbohydrate Polymers*. 2017 Sep;156:460–9.
61. Rioux LE, Turgeon SL. Seaweed carbohydrates. In: *Seaweed Sustainability: Food and Non-Food Applications*. London: Elsevier; 2015. p. 141–92.
62. Kirdponpattara S, Khamkeaw A, Sanchavanakit N, et al. Structural modification and characterization of bacterial cellulose–alginate composite scaffolds for tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*. 2015 Nov;132:146–55.
63. Kanjanamosit N, Muangnapoh C, Phisalaphong M. Biosynthesis and characterization of bacteria cellulose-alginate film. *Journal of Applied Polymer Science*. 2010 Oct;115(3):1581–8.
64. Fitton JH. Seaweeds and their speciality compounds in health and nutrition. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism*. 2014 Dec;1(2014):7.
65. Obluchinskaya ED. Comparative chemical composition of the Barents Sea brown algae. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2008 May;44(3):305–9.
66. Li B, Lu F, Wei X, et al. Fucoidan: Structure and bioactivity. *Molecules*. 2008 Aug;13(8):1671–95.
67. Wang J, Zhang Q, Zhang Z, et al. Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2010 Jan;46(1):6–12.
68. Hahn T, Lang S, Ulber R, et al. Novel procedures for the extraction of fucoidan from brown algae. *Process Biochemistry*. 2012 Jun;47(12):1691–8.
69. Kadam SU, Álvarez C, Tiwari BK, et al. Extraction of biomolecules from seaweeds. *Seaweed Sustainability: Food and Non-Food Applications*. 2015 May;61(20):243–69.
70. Wijesinghe WJJP, Jeon YJ. Enzyme-assisted extraction (EAE) of bioactive components: A useful approach for recovery of industrially important metabolites from seaweeds: A review. *Fitoterapia*. 2012 Oct;83(1):6–12.
71. Stengel DB, Connan S. Marine Algae: a Source of Biomass for Biotechnological Applications. In: *Natural Products From Marine Algae*. New York: Springer; 2015. p. 1–37.

72. Rodriguez-Jasso RM, Mussatto SI, Pastrana L, et al. Microwave-assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from brown seaweed. *Carbohydrate Polymers*. 2011 Jun;86(3):1137–44.
73. Yuan Y, Macquarrie D. Microwave assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from *Ascophyllum nodosum* and its antioxidant activity. *Carbohydrate Polymers*. 2015 Apr;129:101–7.
74. Wijesinghe WJ, Jeon YJ. Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review. *Carbohydrate Polymers*. 2012 Dec;88(1):13–20.
75. Hwang P-A, Yan M-D, Lin H-T, et al. Toxicological Evaluation of Low Molecular Weight Fucoidan in Vitro and in Vivo. *Marine Drugs*. 2016 Jul;14(7):121.
76. Fitton JH, Stringer DN, Karpiniec SS. Therapies from fucoidan: An update. *Marine Drugs*. 2015 Sep;13(9):5920–46.
77. Senthilkumar K, Manivasagan P, Venkatesan J, et al. Brown seaweed fucoidan: Biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013 Jun;60:366–74.
78. Aisa Y, Miyakawa Y, Nakazato T, et al. Fucoidan induces apoptosis of human HS-sultan cells accompanied by activation of caspase-3 and down-regulation of ERK pathways. *American Journal of Hematology*. 2005 Jan;78(1):7–14.
79. Choo GS, Lee HN, Shin SA, et al. Anticancer effect of fucoidan on DU-145 prostate cancer cells through inhibition of PI3K/Akt and MAPK pathway expression. *Marine Drugs*. 2016 Jul;14(7).
80. Zhang Z, Teruya K, Eto H, et al. Induction of apoptosis by low-molecular-weight fucoidan through calcium-and caspase-dependent mitochondrial pathways in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2013 May;77(2):235–42.
81. Pádua D, Rocha E, Gargiulo D, et al. Bioactive compounds from brown seaweeds: Phloroglucinol, fucoxanthin and fucoidan as promising therapeutic agents against breast cancer. *Phytochemistry Letters*. 2015 Sep;14:91–8.
82. Kang SM, Kim KN, Lee SH, et al. Anti-inflammatory activity of polysaccharide purified from AMG-assistant extract of *Ecklonia cava* in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Carbohydrate Polymers*. 2011 Apr;85(1):80–5.
83. Lee SH, Ko CI, Jee Y, et al. Anti-inflammatory effect of fucoidan extracted from *Ecklonia cava* in zebrafish model. *Carbohydrate Polymers*. 2013 Sep;92(1):84–9.
84. Senni K, Gueniche F, Foucault-Bertaud A, et al. Fucoidan a sulfated polysaccharide from brown algae is a potent modulator of connective tissue proteolysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2006 Nov;445(1):56–64.
85. Thomas NV, Kim SK. Fucoidans from marine algae as potential matrix metalloproteinase inhibitors. *Advances in Food and Nutrition Research*. 2014 Jan;72:177–93.
86. Kim K-J, Lee O-H, Lee H-H, et al. A 4-week repeated oral dose toxicity study of fucoidan from the Sporophyll of *Undaria pinnatifida* in Sprague-Dawley rats. *Toxicology*. 2010 Jan;267(1–3):154–8.
87. Murakami K, Aoki H, Nakamura S, et al. Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings. *Biomaterials*. 2010 Sep;31(1):83–90.

88. Trovatti E, Serafim LS, Freire CSR, et al. Gluconacetobacter sacchari: An efficient bacterial cellulose cell-factory. *Carbohydrate Polymers*. 2011 Jun;86(3):1417–20.
89. O'Brien J, Wilson I, Orton T, et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*. 2000 Sep;267(17):5421–6.
90. Araújo R, Bárbara I, Tibaldo M, et al. Checklist of benthic marine algae and cyanobacteria of northern Portugal. *Botanica Marina*. 2009 Feb;52(1):24–46.
91. Rodriguez-Jasso R, Mussatto S, Pastrana L, et al. Chemical composition and antioxidant activity of sulphated polysaccharides extracted from *Fucus vesiculosus* using different hydrothermal processes. *Chemical Papers*. 2014 Apr;68(2):203–9.
92. Baba BM, Mustapha WAW, Joe LS. Effects of extraction solvent on fucose content in fucoidan extracted from brown seaweed (*Sargassum* sp.) from Pulau Langkawi, Kedah, Malaysia. *AIP Conference Proceedings*. 2016 Nov;1784(1):45–50.
93. Smith B. Introduction to Infrared Spectroscopy. In: *Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy*. 2nd ed. New York: CRC Press; 2011. p. 1–17.
94. Ohwaki T, Ishida H. Infrared Spectroscopy for Composites. In: *Characterization of Composite Materials*. London: Elsevier; 1994. p. 184–271.
95. Freitas F, Alves VD, Torres CAV, et al. Fucose-containing exopolysaccharide produced by the newly isolated *Enterobacter* strain A47 DSM 23139. *Carbohydrate Polymers*. 2011 Jan;83(1):159–65.
96. Wang CY, Chen YC. Extraction and characterization of fucoidan from six brown macroalgae. *Journal of Marine Science and Technology (Taiwan)*. 2016 May;24(2):319–28.
97. Barros FCN, da Silva DC, Sombra VG, et al. Structural characterization of polysaccharide obtained from red seaweed *Gracilaria caudata* (J Agardh). *Carbohydrate Polymers*. 2013 Jan;92(1):598–603.
98. Peng J, Yuan J-P, Wu C-F, et al. Fucoxanthin, a Marine Carotenoid Present in Brown Seaweeds and Diatoms: Metabolism and Bioactivities Relevant to Human Health. *Marine Drugs*. 2011 Oct;9(10):1806–28.
99. Silva NHCS, Rodrigues AF, Almeida IF, et al. Bacterial cellulose membranes as transdermal delivery systems for diclofenac: In vitro dissolution and permeation studies. *Carbohydrate Polymers*. 2014 Jun;106:264–9.
100. Pandey A, Sharma RK, Balani K. Introduction to Biomaterials. In: *Biosurfaces: A Materials Science and Engineering Perspective*. New York: Elsevier; 2015. p. 1–64.
101. Taira M, Okazaki M, Takahashi J. Studies on optical properties of two commercial visible-light-cured composite resins by diffuse reflectance measurements. *Journal of Oral Rehabilitation*. 1999 Apr;26(4):329–37.
102. Bahadur NM, Furusawa T, Sato M, et al. Rapid synthesis, characterization and optical properties of TiO₂ coated ZnO nanocomposite particles by a novel microwave irradiation method. *Materials Research Bulletin*. 2010 Oct;45(10):1383–8.
103. Fitton J, Dell'Acqua G, Gardiner V-A, et al. Topical Benefits of Two Fucoidan-Rich Extracts from Marine Macroalgae. *Cosmetics*. 2015 Apr;2(2):66–81.

104. Gayathry G, Gopalaswamy G. Production and characterisation of microbial cellulosic fibre from *Acetobacter xylinum*. *Indian Journal of Fibre and Textile Research*. 2014 Mar;39(1):93–6.
105. Mohammadkazemi F. Surface Properties of Bacterial Nanocellulose Using Spectroscopic Methods and X-Ray Diffraction. 2015 Sep;1(2):10–3.
106. Joy DC. Scanning Electron Microscopy. In: *Materials Science and Technology*. Weinheim: Wiley-VCH; 2006. p. 1–18.
107. Cai Z, Kim J. Bacterial cellulose/poly(ethylene glycol) composite: characterization and first evaluation of biocompatibility. *Cellulose*. 2010 Sep;17(1):83–91.
108. Cai C, Yang G. Bacterial cellulose/collagen composite: Characterization and first evaluation of cytocompatibility. *Journal of Applied Polymer Science*. 2011 Jan;120(5):2938–44.
109. Vyazovkin S. Thermogravimetric Analysis. In: *Characterization of Materials*. 2nd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2012. p. 1–12.
110. Anastasakis K, Ross AB, Jones JM. Pyrolysis behaviour of the main carbohydrates of brown macro-algae. *Fuel*. 2011 Feb;90(2):598–607.
111. Barud HS, Ribeiro CA, Capela JM V, et al. Kinetic parameters for thermal decomposition of microcrystalline, vegetal, and bacterial cellulose. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2011 Aug;105(2):421–6.
112. Martins IMG, Magina SP, Oliveira L, et al. New biocomposites based on thermoplastic starch and bacterial cellulose. *Composites Science and Technology*. 2009 Oct;69(13):2163–8.
113. Qiu Q-Q, Sun W-Q, Connor J. Sterilization of Biomaterials of Synthetic and Biological Origin. In: *Comprehensive Biomaterials II*. London: Elsevier; 2017. p. 180–99.
114. Roeder RK. Mechanical Characterization of Biomaterials. In: *Characterization of Biomaterials*. New York: Elsevier; 2013. p. 49–104.
115. Askeland D, Fulay P, Wright W. Materials science and engineering. In: *The Science and Engineering of Materials*. 6th ed. New York: Cengage Learning; 2011. p. 197–233.
116. Barud HS, Regiani T, Marques RFC, et al. Antimicrobial Bacterial Cellulose-silver Nanoparticles Composite Membranes. *Journal of Nanomaterials*. 2011 Jan;2011(10):1--8.
117. Kanjickal DG, Lopina ST. Modeling of drug release from polymeric delivery systems--a review. *Critical Reviews In Therapeutic Drug Carrier Systems*. 2004 Feb;21(5):345–86.
118. Li SM, Garreau H, Vert M. Structure-property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly-(α -hydroxy acids) in aqueous media. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1990 Oct;1(3):123–30.
119. Pavaloiu RD, Stoica-Guzun A, Dobre T. Swelling studies of composite hydrogels based on bacterial cellulose and gelatin. *UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science*. 2015 Jan;77(1):53–62.
120. Pangestuti R, Kim SK. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *Journal of Functional Foods*. 2011 Oct;3(4):255–66.
121. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al. Cell viability assays. In: *Assay guidance manual*. Bethesda: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2016. p. 1–36.

122. Kim EJ, Park SY, Lee J-Y, et al. Fucoidan present in brown algae induces apoptosis of human colon cancer cells. *BMC Gastroenterology*. 2010 Aug;10(1):96.
123. Yang JW, Yoon SY, Oh SJ, et al. Bifunctional effects of fucoidan on the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006 Jun;346(1):345–50.
124. Lee S-H, Ko C-I, Ahn G, et al. Molecular characteristics and anti-inflammatory activity of the fucoidan extracted from *Ecklonia cava*. *Carbohydrate Polymers*. 2012 Jun;89(2):599–606.